

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Cirugía**



**Papel de la vía arginina: óxido nítrico y de los aminoácidos  
básicos lisina e histidina en un modelo de isquemia-  
reperfusión hepática**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**José Antonio Fraguela Mariña**

**Director**

**José Luis Balibrea Cantero**

**Madrid 2004**

**ISBN: 978-84-8466-984-5**

**© José Antonio Fraguela Mariña, 1995**

**PAPEL DE LA VIA ARGININA: OXIDO NITRICO  
Y DE LOS AMINOACIDOS BASICOS LISINA E HISTIDINA  
EN UN MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSION HEPATICA**

**AUTOR.-** *José A. Fragueta Mariña.*

**DIRECTORES.-** *Prof. J.L. Balibrea Cantero.*

*Prof. J.I. Landa García.*

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Cirugía**

**Madrid, 1.995.**

## INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

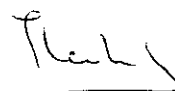
La Tesis Doctoral "PAPEL DE LA VIA ARGININA: OXIDO NITRICO Y DE LOS AMINOACIDOS BASICOS LISINA E HISTIDINA EN UN MODELO DE ISQUEMIA REPERFUSION HEPATICA", - realizada por D. José Antonio Fraguela Mariña, bajo mi dirección, reúne las condiciones necesarias de contenido y forma para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

V.º B.º  
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis



Prof. Landa García  
DNI 50.017.051



Prof. J. L. Balibrea

Fdo.: \_\_\_\_\_  
(fecha y firma)

D.N.I.:

Fdo.: \_\_\_\_\_  
(fecha y firma)

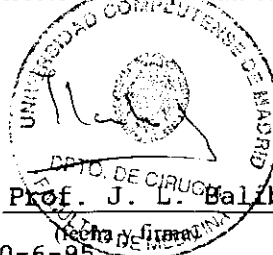
D.N.I.: 2.011.048

## INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

La Tesis Doctoral "PAPEL DE LA VIA ARGININA: OXIDO NITRICO Y DE LOS AMINOACIDOS BASICOS LISINA E HISTIDINA EN UN MODELO DE ISQUEMIA REPERFUSION HEPATICA", - realizada por D. José A. Fraguela Mariña, ha sido considerada por el Consejo del Departamento apta para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

Fecha reunión  
Consejo Departamento  
8 de junio de 1995

El Director del Departamento



Fdo.: Prof. J. L. Balibrea

20-6-95

*A mi esposa, Isabel,  
y a mis hijos Sonia y Fernando.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Profesor D. José Luis Balibrea Cantero, Catedrático de Cirugía de la Universidad Complutense de Madrid, por haber aceptado la dirección de esta tesis, allanando todos los obstáculos que encontré a lo largo de esta empresa.

Al Profesor D. José Ignacio Landa García, por su apoyo decidido en los momentos difíciles y por su inestimable capacidad profesional, sin cuya dedicación y consejos este trabajo no hubiera visto nunca la luz.

Al Dr. C. Gómez Freijoso, jefe del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo "A" del Hospital Juan Canalejo de La Coruña, por su apoyo y ayuda en momentos claves para el desarrollo de mi carrera profesional.

Al Dr. D. Antonio Lorenzo Fernández de Sanmamed, por su capacidad científica y desinteresada colaboración en la realización de las determinaciones bioquímicas.

A la Dra. D<sup>a</sup> M. Grau y al Dr. A. Centeno, veterinarios, cuyos consejos sobre técnica quirúrgica y manejo de los animales de experimentación fueron de extraordinario valor.

A Covadonga Lemos e Isabel López, ATS del Centro experimental del Hospital Juan Canalejo de La Coruña, por la gran colaboración prestada durante el trabajo experimental.

A los Drs. J.M. Ramia, B. Acea, C. Bonhome y F. Alvarez por su ayuda en el estudio estadístico y la realización de los gráficos.

Al Dr. F. Sánchez González, jefe de Sección del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo "A" del Hospital Juan Canalejo de La Coruña, y a todos los miembros de dicho Servicio por su colaboración y apoyo en el desarrollo de las tareas diarias.

Y a todos aquellos que de una u otra forma han contribuido a la realización de esta tesis.

**INDICE**



**ISQUEMIA-REPERFUSION HEPATICA.**

- Introducción.	2
- Metabolitos reactivos del oxígeno.	4
- Formación y destrucción de metabolitos reactivos del oxígeno.	9
- Efectos de la generación de radicales oxigenados en los componentes y funciones celulares.	23
- Prevención de la lesión celular durante el período isquémico.	30
- Protección del hígado tras la reperfusión.	31
- Mecanismos protectores contra la lesión por reoxigenación.	32

**VIA ARGININA:OXIDO NITRICO.** 34

- Introducción.	35
- Factor de relajación derivado del endotelio y NO.	36
- Biosíntesis.	40
- Acciones.	41
- NO y lesión por reoxigenación.	51

**ANATOMIA DEL HIGADO DE LA RATA WISTAR.** 53

**PLANTEAMIENTOS GENERALES Y OBJETIVOS.** 57

**MATERIAL Y METODOS.** 61

**RESULTADOS.** 72

**DISCUSION.** 113

**CONCLUSIONES.** 131

**BIBLIOGRAFIA.** 133

**ISQUEMIA-REPERFUSION HEPATICA**

## **INTRODUCCION**

El avance de la cirugía en los últimos años ha permitido realizar técnicas quirúrgicas que hasta entonces eran inimaginables. El abordaje hepático en traumatismos y tumores requiere en muchas ocasiones someter al hígado a un período de isquemia variable hasta lograr el control de la lesión<sup>1</sup>. El flujo hepático se reduce también en situaciones tales como shock hemorrágico y sepsis. La ligadura de la arteria hepática que se realiza para tratamiento de ciertos tumores, anomalías vasculares o en algunos traumatismos hepáticos reduce considerablemente el flujo hepático, al menos inicialmente<sup>22</sup>. Este período de isquemia alcanza su cota máxima en el caso del trasplante hepático, de tal forma que la viabilidad del injerto depende en gran medida de los acontecimientos fisiopatológicos que se producen durante el período de isquemia y posterior revascularización.

Cuando un órgano se ve sujeto a un período de isquemia, se inician una sucesión de reacciones químicas en sus tejidos que pueden culminar en disfunción y necrosis celulares. Aunque no se puede identificar un proceso único como originario de la lesión tisular inducida por la isquemia, la mayoría de los estudios indican que la muerte celular sobreviene por el agotamiento de las reservas energéticas celulares y la acumulación de metabolitos tóxicos en su interior<sup>21</sup>. La recuperación de los tejidos isquémicos pasa por el restablecimiento del flujo sanguíneo que contribuiría a la regeneración de la carga celular y a la eliminación de los metabolitos tóxicos generados durante el período de isquemia. Paradójicamente la reperusión de los tejidos isquémicos desencadena una serie

de acontecimientos que acaban produciendo su lesión.

Diversos estudios han demostrado que la lesión producida por la reperfusión puede ser más grave que la provocada por la propia isquemia. Se ha comprobado que la reperfusión anóxica de los tejidos isquémicos produce muy poca lesión<sup>1,2</sup>, por lo que se sugiere que el retorno de sangre oxigenada hacia el órgano isquémico, contribuiría a la formación de oxidantes citotóxicos derivados, probablemente, del oxígeno molecular.

Aunque la reperfusión de los tejidos isquémicos parece incrementar la lesión microvascular parenquimatosa producida durante la isquemia, este fenómeno ocurre sólo después de un período relativamente breve de ausencia de flujo sanguíneo. Al prolongarse el período isquémico, el efecto dañino de la privación de oxígeno de los tejidos supera a la lesión producida por la reperfusión. Por tanto, bajo condiciones de isquemia prolongada o breve el restablecimiento del flujo sanguíneo no afectará de manera importante la viabilidad final del tejido.

## **METABOLITOS REACTIVOS DEL OXIGENO**

La observación de que la reperusión y la consiguiente reoxigenación de los tejidos isquémicos los lesiona, dió origen al concepto de que la lesión por reperusión puede encontrarse mediada, al menos parcialmente, por formación de metabolitos reactivos al oxígeno<sup>2</sup>. El oxígeno molecular es una sustancia altamente reactiva particularmente en presencia de carbono, hidrógeno y nitrógeno. Muchas células utilizan el potencial oxidativo del oxígeno para producir su reducción completa (tetraivalente) a agua, en el sistema citocromo, con el fin de generar ATP. Este proceso se denomina glicolisis aerobia<sup>8,32</sup>. La reducción univalente del oxígeno produce especies altamente reactivas (Fig 1):  $H_2O_2$  y los radicales libres superóxido ( $O_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Se define a los radicales libres como especies moleculares que contienen un número impar de electrones en su orbital externo siendo, por tanto, potentes agentes oxidantes o reductores<sup>32,33,34</sup>. Si dos radicales reaccionan entre sí, ambos radicales son eliminados. Si un radical reacciona con un no radical, puede producirse un radical libre. Estas moléculas, mucho más reactivas que el oxígeno molecular, representan una gran amenaza para la integridad celular. Por tanto, probablemente las primitivas medidas para su detoxificación aparecieron antes de la evolución del sistema citocromo. Estos mediadores incluyen superóxido dismutasa, catalasas y peroxidasas<sup>32</sup> (Fig. 2).

El oxígeno molecular, por tanto, puede aceptar en total cuatro electrones para formar agua; sin embargo, se puede reducir en pasos univalentes para generar tres

especies oxidantes<sup>5</sup>. La reducción univalente del oxígeno produce el anión radical superóxido ( $O_2^-$ ). La agresión celular derivada del superóxido suele atribuirse a su función como precursor de especies más reactivas de oxígeno. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se produce como resultado de la reducción bivalente de  $O_2^-$  o dismutación del  $O_2^-$ . La dismutación espontánea del  $O_2^-$  prosigue con rapidez en solución acuosa; por tanto, la producción de  $O_2^-$  in vivo se acompaña de manera inalterable de producción de  $H_2O_2$ . El tercer tipo de radical que deriva del oxígeno molecular es el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), que se forma por interacción del  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  (reacción de Haber-Weiss), y es un agente oxidante potente<sup>5,6</sup>.

La formación de radical de oxígeno es perjudicial para una serie de biomoléculas que se encuentran en los tejidos tales como ácidos nucleicos, enzimas, receptores, etc.<sup>3,20</sup> Los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en la membrana son muy sensibles al ataque del  $\cdot OH$  dando lugar a un proceso que se denomina peroxidación de los lípidos, que altera la fluidez de dicha membrana y la distribución celular en compartimentos, lo que dará como consecuencia lisis celular. Por tanto, la peroxidación de los lípidos y la lesión de las proteínas iniciadas por el radical de oxígeno puede contribuir al trastorno de la función y necrosis celular que acompaña a la reperfusión de los tejidos isquémicos.

Las pruebas de participación de los metabolitos reactivos de oxígeno en la lesión por reperfusión se basan en el empleo de agentes que restringen la producción de estos oxidantes citotóxicos, o que actúan como depredadores después de la producción de estos oxidantes<sup>34</sup>. Se cuenta con pruebas de que los oxidantes median tanto la

permeabilidad microvascular incrementada producida durante una hora de isquemia y reperfusión como las lesiones celulares producidas tras tres horas de isquemia y reperfusión. Tanto la dismutasa del superóxido como el diisopropilsalicilato de cobre (Cu-DIPS), mimético de la dismutasa del superóxido, atenúan en grado importante los incrementos de la permeabilidad microvascular inducidos por la reperfusión. Los oxidantes derivados del superóxido desempeñan una función de mayor importancia en la aparición de la lesión que el propio anión superóxido; así, la catalasa, enzima que cataliza la desproporción entre  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ , ha resultado protectora en muchos modelos de isquemia y reperfusión<sup>4</sup>. También atenúan este tipo de lesión depredadores no enzimáticos del radical hidroxilo, entre ellos dimetilsulfóxido (DMSO), dimetiltiourea y manitol. Dado que el  $\cdot\text{OH}$  se forma a partir de  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y que los depredadores del  $\cdot\text{OH}$  ofrecen niveles de protección semejantes a los observados con la dismutasa de peróxido o la catalasa, muchos investigadores han sugerido que el radical dañino de primer orden es el radical hidroxilo derivado de manera secundaria. Los efectos protectores de dismutasa de superóxido, catalasa y depredadores del radical hidroxilo son compatibles con el criterio de que se forma un radical hidroxilo altamente citotóxico durante la reperfusión por medio de la reacción de Haber-Weiss. Se asume, en general, que la reacción de Haber-Weiss ocurre a un ritmo muy bajo para tener importancia fisiológica; sin embargo, la reacción se puede acelerar en gran medida por la presencia de metales de transición (por ejemplo, hierro) que actúan como catalizadores. El tratamiento previo con deferoxamina (quelador del hierro) o apotransferrina (proteína fijadora de hierro) atenúa de manera importante el incremento de la permeabilidad vascular después de la reperfusión.

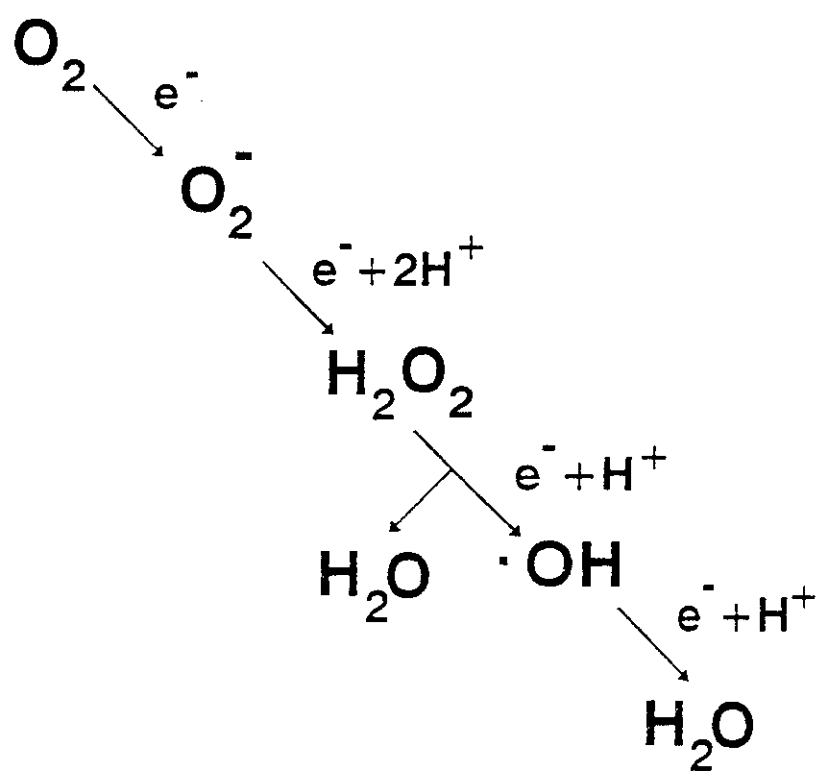


Fig. 1.- Via univalente para la reducción del oxígeno molecular.



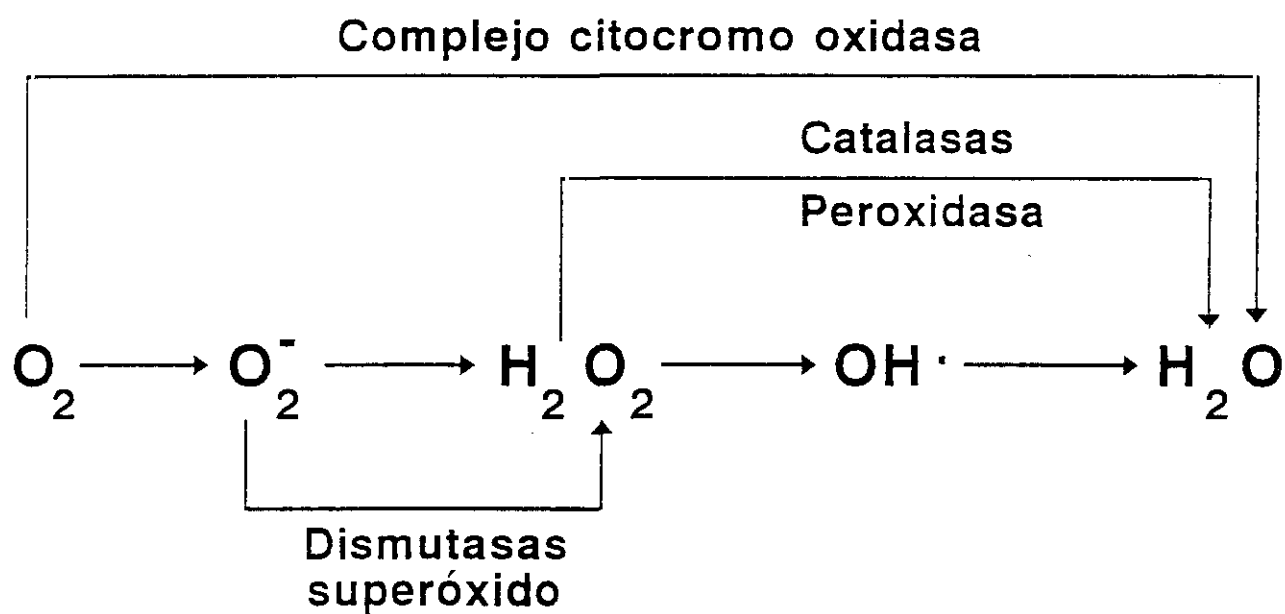


Fig. 2.- Mecanismos enzimáticos endógenos de detoxificación de radicales libres de oxígeno generados por la reducción univalente de oxígeno molecular.

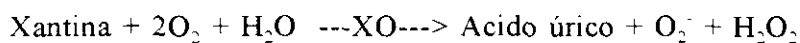
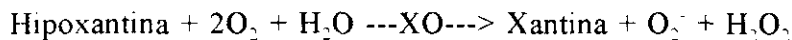
## **FORMACION Y DESTRUCCION DE LOS METABOLITOS**

### **REACTIVOS DEL OXIGENO**

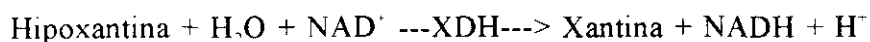
El radical superóxido en las células animales puede formarse por vía enzimática o por vía no enzimática, siendo la enzimática la más importante.

#### **A.- Vía enzimática.**

La xantinaoxidasas es la enzima limitadora de la degradación del ácido nucleico, por medio de la cual todas las purinas se destinan a la oxidación terminal. La xantinaoxidasas (XO) tiene capacidad de generar  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$  durante la oxidación de hipoxantina a xantina:



En condiciones normales, la xantinaoxidasas se encuentra en las células sanas no isquémicas, sobre todo en forma de deshidrogenasa de xantina dependiente del  $\text{NAD}^+$  (XDH)<sup>7</sup>. Esta forma de la enzima emplea  $\text{NAD}^+$  en vez de  $\text{O}_2$  como aceptador de electrones durante la oxidación de las purinas, y no produce  $\text{O}_2^-$  ni  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



La xantinodeshidrogenasa se convierte en la forma productora de oxidantes llamada xantinoxidasa durante la isquemia<sup>7,8</sup>. La conversión de xantinodeshidrogenasa en xantinoxidasa puede producirse por dos mecanismos: conversión reversible por oxidación o bien conversión irreversible por proteólisis. El grado de conversión es proporcional a lo que dura la isquemia. En el ser humano la actividad más elevada de xantinoxidasa la tienen el hígado y el intestino. El proceso comienza con la disminución del flujo sanguíneo a los tejidos, lo que limita la disponibilidad de oxígeno para formar ATP. Como la carga energética celular disminuye, no será capaz de mantenerse durante mucho tiempo el gradiente de iones a través de las membranas, lo que aboca a una redistribución de los iones de Ca. El aumento de Ca intracitosólico activa una proteasa capaz de convertir la deshidrogenasa en oxidasa. Concomitantemente la deplección de ATP celular resulta en una elevada concentración de AMP. El AMP es catabolizado a adenosina, inosina e hipoxantina. Cuando se restablece el flujo sanguíneo al órgano isquémico, la hipoxantina es oxidada a xantina y durante esta reacción regulada por xantino oxidasa se forman radicales libres de oxígeno<sup>28,33,34</sup> (Fig. 3).

Se han empleado ampliamente los inhibidores de la xantinoxidasa alopurinol, oxipurinol y aldehído de la pterina para valorar la contribución de esta enzima a la lesión por reperfusión. Todos los inhibidores atenúan de manera importante tanto la necrosis celular como el incremento de la permeabilidad microvascular, lo que sugiere que la xantinoxidasa es una productora importante de oxidantes después de la reperfusión.

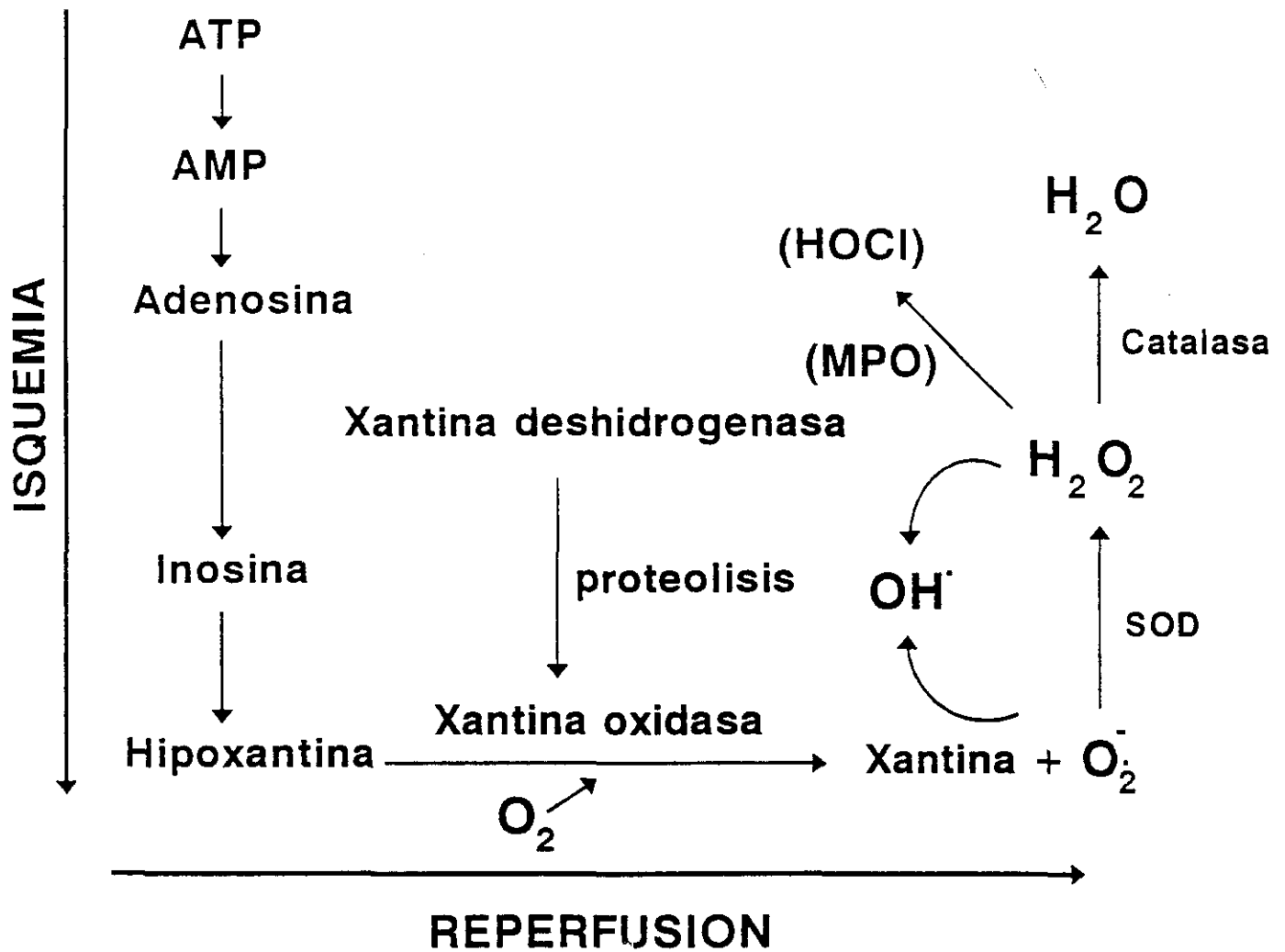


Fig. 3.- Mecanismo propuesto para la inducción de  $O_2^-$  producido por isquemia.

Otras pruebas en favor de la teoría de que la xantinaoxidasa es una productora importante de metabolitos reactivos del oxígeno proviene de estudios en los que se produjo deficiencia de xantinaoxidasa tisular mediante administración de una dieta complementada con tungsteno y deficiente en molibdeno<sup>9</sup>. El tungsteno sustituye al molibdeno en el sitio activo de la xantinaoxidasa, lo que la vuelve inactiva.

Otro producto potencial de metabolitos reactivos del oxígeno en los tejidos postisquémicos es el leucocito polimorfonuclear neutrófilo<sup>38</sup>. Los neutrófilos contienen una NADPH oxidasa que reduce el oxígeno molecular hasta el anión superóxido. Los neutrófilos activados secretan también la enzima mieloperoxidasa (MPO), que cataliza la formación de ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrógeno y de iones cloruro:



El peróxido de hidrógeno que se necesita para formar ácido hipocloroso se deriva de la dismutación espontánea del superóxido derivado de la NADPH.

El ácido hipocloroso es un agente oxidante y clorante potente, aproximadamente 100 veces más reactivo que el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Reacciona con rapidez con las aminas primarias ( $\text{RNH}_2$ ) para producir derivados N-clorados ( $\text{RNHCl}$ ), que tienen la equivalencia oxidante del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y del  $\text{HOCl}$ . Las N-cloraminas lipófilas son causas probables de la lesión celular que acompaña a la producción de  $\text{HOCl}$ . La citotoxicidad que se observa cuando hay  $\text{HOCl}$  y N-cloraminas puede ser mediada por oxidación de los sulfhidrilos, inactivación de la proteína hem y el citocromo y degradación de los

aminoácidos y las proteínas.

Los neutrófilos activados además de generar un gran flujo superóxido, pueden descargar también diversas enzimas (elastasa, colagenasa) que lesionan las células parenquimatosas y la microvasculatura.

Los metabolitos reactivos del oxígeno desempeñan una función importante en el reclutamiento de neutrófilos<sup>10</sup>. La capacidad de inhibidores de la xantinaoxidasa, depredadores del radical oxígeno y un quelador del hierro para interferir con la infiltración de neutrófilos inducida por la reperfusión, sugiere que los oxidantes derivados de la xantinaoxidasa, producidos en las células epiteliales y endoteliales, desempeñan una función en el reclutamiento de los neutrófilos en el tejido postisquémico al iniciar la producción y descarga de agentes proinflamatorios, que atraen a continuación a los neutrófilos y los activan. Esta hipótesis explicaría por qué los agentes como alopurinol, dismutasa de superóxido, catalasa, dimetiltiliurea y deferoxamina atenúan tanto la infiltración de neutrófilos como la lesión microvascular inducida por reperfusión postisquémica<sup>6</sup>.

Una cuestión importante originada en estas observaciones consiste en saber si la acumulación y la activación de los neutrófilos es una causa o un efecto de la lesión por reperfusión. Se ha recurrido a dos criterios para definir la función de los neutrófilos en la lesión por reperfusión: deficiencia de neutrófilos por medio de suero antineutrófilo, y prevención de la adherencia de estos leucocitos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas de adherencia leucocítica. La administración de suero antineutrófilo atenúa de manera importante el incremento de la permeabilidad microvascular inducida por

la reperfusión postisquémica. Los resultados indican que los neutrófilos son los mediadores primarios de los incrementos de la permeabilidad microvascular inducidos por reperfusión.

Se ha demostrado que la glucoproteína de la membrana de los neutrófilos CD18 desempeña una función de gran importancia en la mediación de la adherencia de los neutrófilos al endotelio microvascular. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el epítipo funcional común CD18 inhiben quimiotaxis, agregación y adherencia a las monocapas endoteliales de neutrófilos<sup>11</sup>. Estos anticuerpos monoclonales se han empleado para examinar la función de la adherencia de los leucocitos en la lesión microvascular y de las células parenquimatosas inducida por la reperfusión de los tejidos isquémicos. La administración de anticuerpo monoclonal es tan eficaz como la neutropenia para atenuar el incremento de la permeabilidad microvascular inducida por reperfusión. Estos datos indican que la adherencia de los neutrófilos al endotelio microvascular es un componente esencial de la lesión por reperfusión mediada por neutrófilos.

La reperfusión promueve la adherencia de los leucocitos al endotelio vascular y las interacciones entre leucocitos y células endoteliales inducidas por la reperfusión están mediadas por el complejo glucoproteínico de adherencia leucocítica CD11-CD18<sup>36,37</sup>.

Los oxidantes derivados de la xantinaoxidasa inician la adherencia de los leucocitos al endotelio microvascular desencadenada por la reperfusión de los tejidos isquémicos.

No está claro el mecanismo por el cual el superóxido media la adherencia de los leucocitos dependiente del endotelio; sin embargo, se ha sugerido que el superóxido

puede entrar en interacción con la sustancia antiadherente derivada de la célula endotelial e inactivarla.

El óxido nítrico es una sustancia biológicamente activa que producen las células endoteliales, y a la cual inactiva el superóxido<sup>12,13</sup>. Impide la adherencia de las plaquetas a las monocapas endoteliales. Además inhibe la agregación de los neutrófilos in vitro, efecto potencializado al añadir dismutasa de superóxido. Ante estas observaciones, los investigadores se dispusieron a verificar si la producción endógena de óxido nítrico desempeña una función importante en la adherencia de los neutrófilos al endotelio vascular. La perfusión del mesenterio del gato con un inhibidor del óxido nítrico da por resultado un incremento de quince veces el número de leucocitos adheridos al endotelio venular. Cabría esperar, según estas informaciones, que la disminución de la producción de óxido nítrico o el aumento de la inactivación del mismo fomentaría la adherencia leucocítica. Como el superóxido inactiva al óxido nítrico, debería suponerse que las situaciones relacionadas con incremento de la producción de superóxido (por ejemplo, lesión por reperfusión) contribuirían a aumentar la adherencia de los leucocitos, y que la dismutasa del superóxido sería antiadherente. En realidad, algunos autores han señalado que la dismutasa del superóxido atenúa la adherencia de los leucocitos en las vénulas mesentéricas<sup>14</sup>, en tanto que otros investigadores han demostrado que el óxido nítrico ofrece protección contra la lesión por reperfusión<sup>12</sup>. Estas observaciones son congruentes con la hipótesis de que las acciones beneficiosas de la dismutasa del superóxido pueden atribuirse en parte a su capacidad para prevenir la inactivación del óxido nítrico.

Los resultados de los estudios anteriores implican a los oxidantes derivados



de la xantinaoxidasa en el reclutamiento de leucocitos inducido por la reperusión<sup>39,40</sup>; sin embargo, no ha podido identificarse todavía la sustancia que media este proceso. Aunque parece poco probable que los metabolitos reactivos del oxígeno sean directamente los iniciadores de la adherencia y la activación de los leucocitos, es concebible que estos oxidantes entren en interacción con las membranas celulares endoteliales para activar la fosfolipasa  $A_2$  y, en consecuencia, produzcan formación de sustancias quimiotáxicas leucocíticas poderosas como el leucotrieno  $B_4$  ( $LTB_4$ ) y factor activador de plaquetas (PAF).

Existen pruebas de que los radicales derivados del oxígeno dan por resultado activación de la fosfolipasa  $A_2$ , y producen enseguida generación de  $LTB_4$ , PAF o ambos. Son varios los argumentos a favor de esta hipótesis: La exposición de las células a los oxidantes produce activación de la fosfolipasa  $A_2$ ; la reperusión del tejido isquémico produce activación de la fosfolipasa  $A_2$ ; los inhibidores de la fosfolipasa  $A_2$  atenúan la infiltración de neutrófilos de la mucosa intestinal inducida por reperusión; y los estimulantes pueden aumentar la síntesis de PAF por las células endoteliales cultivadas y promover, a continuación, la adherencia de los neutrófilos a las monocapas endoteliales.

Aunque los estudios mencionados implican una función de los oxidantes derivados de las células parenquimatosas en la adherencia de los leucocitos inducida por la reperusión, investigaciones recientes sugieren que también contribuyen a este proceso de adherencia los oxidantes derivados de los neutrófilos. Diversos autores examinaron recientemente los efectos de  $H_2O_2$  y de los oxidantes derivados de la mieloperoxidasa HOCl y la monocloramina a concentraciones producidas por los neutrófilos activados sobre

la adherencia de los leucocitos en las vénulas postcapilares<sup>15</sup>. Los resultados de estos experimentos indican que  $H_2O_2$  y monocloramina promueven la adherencia de los leucocitos al endotelio venular, no así el HOCl. En estos experimentos in vivo, el anticuerpo monoclonal IB<sub>4</sub> impidió en gran medida la adherencia inducida por  $H_2O_2$  y monocloramina, lo que indica que ambos oxidantes promueven la adherencia de los leucocitos al activar la glucoproteína CD11-CD18. Los experimentos con citometría de flujo ponen de manifiesto que monocloramina y  $H_2O_2$  regulan en sentido ascendente directamente la CD11-CD18 sobre la superficie de los neutrófilos. La adherencia de los leucocitos inducida por  $H_2O_2$  en las vénulas postcapilares parece mediada por el PAF, puesto que los antagonistas de los receptores de PAF redujeron la adherencia de los leucocitos en cerca del 50%. Estos resultados sugieren la presencia de una acción fisiológica importante del  $H_2O_2$  derivada de los neutrófilos, que consiste en estimular la producción de PAF (al parecer por el endotelio vascular), lo que a su vez promueve la adherencia de los leucocitos por regulación ascendente de la glucoproteína de adherencia leucocítica CD11-CD18<sup>36,37</sup>.

Diversos estudios se inclinan a favor de una función de los neutrófilos en la lesión microvascular inducida por reperfusión; sin embargo, no está claro el mecanismo por el que los neutrófilos logran acceso al compartimento intersticial adyacente. Los neutrófilos activados liberan diversas enzimas capaces de lesionar la microvasculatura, entre ellas colagenasa, gelatinasa y elastasa. Con objeto de que los neutrófilos circulantes logren acceso al intersticio, deben adherirse en primer lugar a la superficie del endotelio microvascular, emigrar entre las células endoteliales adyacentes y penetrar en la membrana

basal. No han podido dilucidarse aún las fuerzas físicas y químicas que permiten a los neutrófilos cruzar la pared vascular. Se ha demostrado *in vitro* que los leucocitos adherentes son capaces de degradar diversos componentes estructurales de la membrana basal, y que los inhibidores de la elastasa previenen esta degradación mediada por los neutrófilos. Con objeto de comprobar el mecanismo de acción de la elastasa sobre la infiltración de los neutrófilos inducida por la reperfusión, se examinaron vénulas mesentéricas por medio de técnicas microscópicas intravitales. Estos experimentos pusieron de manifiesto que la inhibición de la elastasa atenuaba la tasa de adherencia y emigración de los leucocitos; sin embargo, la inhibición de la elastasa ejerció un efecto mayor sobre la migración de los neutrófilos, lo que indica que la descarga de elastasa es más importante para el desplazamiento de los neutrófilos a través de la pared vascular<sup>6</sup>. Por tanto, la descarga de elastasa desde los neutrófilos activados puede ser un factor de importancia en la infiltración de neutrófilos inducida por reperfusión.

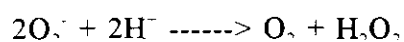
Se sabe poco acerca de los factores que promueven la adherencia de los leucocitos durante la isquemia. Las fuerzas de fricción producidas por el flujo sanguíneo desempeñan una función muy importante en el trastorno de los enlaces adherentes entre leucocitos y endotelio. Los estudios *in vivo* indican que las fuerzas hidrodinámicas secundarias a la velocidad y la tasa de fricción del flujo sanguíneo ejercen una influencia considerable sobre las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales; sin embargo no ha podido aclararse aún la importancia de estas fuerzas en ausencia de un estímulo inflamatorio. Al parecer, la isquemia con reducción de la fricción desencadena un incremento reversible de la adherencia de los leucocitos, cuya magnitud está relacionada

en proporción inversa con la fuerza de fricción<sup>16</sup>. Esta adherencia dependiente del grado de fricción está mediada por la glucoproteína de adherencia CD11-CD18, puesto que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra esta glucoproteína anulan la reacción.

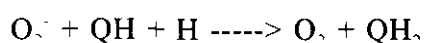
### **B.-Vía no enzimática.-**

La formación de  $O_2^-$  por esta vía puede producirse a través de la oxidación de semiquinonas y otros compuestos "redox-lábiles" (por ejemplo, ciertos  $Fe^{2+}$  quelatos). Las quinonas de origen endógeno y exógeno pueden pasar un electrón a través de NADH o NADPH ligado a flavoenzimas, por ejemplo, NADH deshidrogenasa mitocondrial o el NADH-citocromo  $b_5$  microsomial y NADPH-citocromo P-450 reductasas, dando lugar a semiquinonas que son rápidamente oxidadas por  $O_2$  con la formación de  $O_2^-$ . Normalmente el grado de producción de  $O_2^-$  debido a este tipo de ciclo redox es relativamente pequeño, menos del 2% del total de oxígeno consumido por la respiración, y se origina a través de algunos componentes del sistema de transporte de electrones mitocondrial en la región de ubiquinona<sup>5,17</sup>, aunque no necesariamente a través de la oxidación de la propia ubisemiquinona<sup>18</sup>. La cantidad de  $O_2^-$  producido puede incrementarse ampliamente ante la presencia de ciertos agentes exógenos, especialmente quinonas (por ejemplo, menadiona o adriamicina).

La remoción del  $O_2^-$  se produce por dismutación:

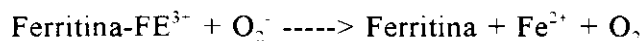


tanto espontánea como, más eficazmente, a través del enzima superóxido dismutasa (SOD). Las células animales contienen dos isoenzimas de SOD, un enzima Cu-Zn localizada en el citosol y un enzima Mn localizado en la mitocondria. Existen evidencias de que al menos el enzima Cu-Zn puede actuar también como una superóxido-semiquinona oxidorreductasa, catalizando la reacción:



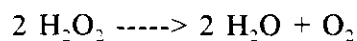
donde Q es una quinona.

Además parece ser que el  $\text{O}_2^-$  puede servir como un donador de electrones para la movilización de Fe desde ferritina:

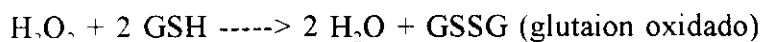


que puede ser una función fisiológica del  $\text{O}_2^-$ .

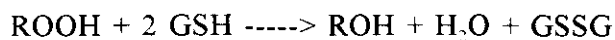
El peróxido de hidrógeno formado a través de SOD es metabolizado por una catalasa y varias peroxidasas:



o por glutathion (GSH) peroxidasa:

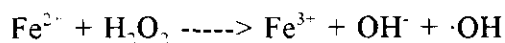


La mayor parte de la catalasa se localiza en los peroxisomas, que son también el asiento de varias flavin oxidasas (glucosa oxidasas, D-aminoácido oxidasas, oxidasas de ácidos grasos, etc.). La glutathion peroxidasa, que es una selenoenzima, se localiza parcialmente en la mitocondria y parcialmente en el citosol, la misma localización de SOD. También sirve como un catalizador para la reducción de peróxidos orgánicos (ROOH):

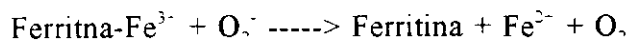


Además existe una selenoenzima fosfolípido-hidroperóxido-glutathion peroxidasa que es similar a la glutathion peroxidasa, pero es específica para fosfolípidos hidroperóxidos. Esta peroxidasa probablemente sirve para detoxificar fosfolípidos de membrana que han sufrido peroxidación.

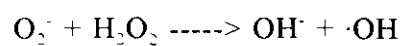
La formación de radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) en sistemas biológicos puede producirse por vía no enzimática a través de la reacción de Fenton:



donde el Fe puede estar libre o confinado a un ligador orgánico. Cuando se produce una reducción  $\text{O}_2^{\cdot -}$  dependiente de  $\text{Fe}^{3+}$  así formado, como en el caso de ferritina:



la suma de las dos reacciones da la reacción de Haber-Weiss:



que es una generación del radical hidroxilo catalizada por Fe desde el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno. La reacción tipo Fenton puede ocurrir también con peróxidos orgánicos<sup>5</sup>.

## **EFFECTOS DE LA GENERACION DE RADICALES OXIGENADOS EN LOS COMPONENTES Y FUNCIONES CELULARES**

*Los efectos de la generación de radicales oxigenados en los componentes y funciones celulares pueden ser divididos en dos categorías<sup>5</sup>: primarios y secundarios.*

Los efectos primarios son aquellos causados directamente por los radicales oxigenados en los componentes y funciones celulares. Requieren Fe y se dirigen a la peroxidación de los lípidos con consecuente daño de membrana y depósito de granos de lipofucsina, o a la modificación de proteínas y ácidos nucleicos, causando inactivación enzimática y rotura de las cadenas de ADN.

Los efectos secundarios consisten en un trastorno en la homeostasis celular del  $\text{Ca}^{2+}$ , abocando a un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol y una consecuente activación de las proteasas y fosfolipasas citosólicas. Estos efectos causan destrucción del citoesqueleto y activación de enzimas tales como la xantinaoxidasa y NADPH oxidasa, que dan lugar a posterior formación de radicales oxigenados. Estos efectos secundarios no son dependientes del Fe, pero los dos tipos de efectos pueden ampliarse sinérgicamente.

Los efectos primarios de los radicales de oxígeno son consecuencia de una peroxidación de los lípidos<sup>35</sup>. Se cree que este proceso es iniciado por un radical perferil ( $\text{Fe}^3-\text{O}_2^-$ ) donde el  $\text{Fe}^{3+}$  es confinado a un adecuado quelante<sup>19</sup>. Alternativamente la peroxidación de los lípidos puede iniciarse también usando un generador de  $\text{O}_2^-$ , como por ejemplo, hipoxantina y xantinaoxidasa, en combinación con un adecuado quelante de  $\text{Fe}^{3+}$ . Como ya se comentó, la peroxidación de los fosfolípidos de membrana puede producir una



severa lesión celular seguida por disrupción y lisis de las organelas intracelulares y por tanto de la célula. La peroxidación de los lípidos parece ser así mismo responsable de la formación de gránulos de lipofucsina, también llamados gránulos de la vejez, que consisten en el depósito de lípidos peroxidados insolubles y proteínas.

Otra clase de efectos primarios causados por los radicales de oxígeno son aquellos producidos por el radical  $\cdot\text{OH}$ . Estos efectos no son dependientes de Fe per se, pero la formación del radical  $\cdot\text{OH}$  a través de la reacción de Fenton y de Haber-Weiss requiere Fe. El radical hidroxilo es un poderoso oxidante de ciertos residuos de aminoácidos, purinas y pirimidinas, bases en las proteínas y ácidos nucleicos, respectivamente, causando de este modo inactivación enzimática y rotura de cadenas de ADN.

Los efectos secundarios de los radicales de oxígeno que producen lesión tisular se cree que son debidos a trastornos en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  celular. En condiciones fisiológicas, las células animales mantienen una determinada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que es unas cuatro veces menor que el extracelular. Una parte significativa del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular está secuestrado en el retículo endoplasmático (RE) y en la mitocondria. El gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol, en relación al espacio extracelular y el RE, es mantenido por una bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa dependiente; por el contrario el secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria opera a través de un mecanismo electrogénico localizado en el interior de la membrana mitocondrial y conducido por la fuerza de protones generada por el sistema de fosforilación oxidativa. La distribución del  $\text{Ca}^{2+}$  tisular está sujeto a un intrincado mecanismo de control mediado por receptores, que implica varias hormonas y

otros efectores, cuya función es regular la actividad de las enzimas citosólicas  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes, tales como adenilciclasa, ciertas proteasas y fosfolipasas.

El stress oxidativo puede transtornar la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular depleccionando los niveles de GSH a través de la glutathion peroxidasa. Este transtorno tendrá dos consecuencias: Una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE debido a una activación de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, y una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la mitocondria, debido a la oxidación, via glutathion reductasa y nicotinamida nucleótido transhidrogenasa, del NADPH mitocondrial, y una consecuente activación del mecanismo de eflujo del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. Como consecuencia de ello se incrementa el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  también puede provenir del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular provocado por una inactivación de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática, lo que también puede ocurrir cuando está depleccionado el GSH celular. Sin embargo, las evidencias actuales indican que el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que aparece durante el stress oxidativo se origina primariamente a partir de una redistribución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En el caso de isquemia el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico también ocurriría a partir de los tres orígenes (RE, mitocondrias y espacio extracelular), debido a una disminución del ATP celular y, generalmente, del nivel de energía.

El incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico tendría dos tipos de efectos: una activación de las proteasas citosólicas  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes y una activación de la fosfolipasa  $\text{A}_2$ . Una de estas proteasas provoca una rotura del citoesqueleto, lo que conduce a un daño severo con arrugamiento de la superficie celular. Otra proteasa citosólica activada por  $\text{Ca}^{2+}$  es la que causa la conversión de xantinodeshidrogenasa en xantinooxidasa.

Otra consecuencia del incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico es la activación de la fosfolipasa  $\text{A}_2$ , con la consecuente liberación de ácido araquidónico desde los fosfolípidos, poniendo en acción la "cascada del ácido araquidónico", lo que promueve la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos<sup>40</sup> (Fig. 4). Existen evidencias de que los metabolitos del ácido araquidónico inducen lesión endotelial en isquemia-reperfusión, independientemente de los neutrófilos. Hay, sin embargo, tres mecanismos por los que los productos del ácido araquidónico ejercen influencia sobre los neutrófilos en la lesión por perfusión.

En primer lugar, pueden actuar como quimioatrayentes induciendo la adhesión de los neutrófilos al endotelio. El producto de la lipooxigenasa leucotrieno  $\text{B}_4$  y el producto de la ciclooxygenasa tromboxano  $\text{A}_2$  son potentes quimiotácticos<sup>41,42</sup>. Existen evidencias de que el leucotrieno  $\text{B}_4$  es generado en suficiente cantidad en isquemia perfusión para inducir la diapedesis de los neutrófilos<sup>43</sup>. Otras observaciones indican que los productos de la lipooxigenasa son de central importancia en la lesión por perfusión.

En segundo lugar los productos del ácido araquidónico pueden activar a los neutrófilos para producir más radicales de oxígeno y, por tanto, enzimas proteolíticas. El leucotrieno  $\text{B}_4$  es un potente estimulador para la generación de peróxido de hidrógeno y elastasa por los neutrófilos<sup>44</sup>, induciendo permeabilidad endotelial. El tromboxano  $\text{A}_2$  también activa los neutrófilos y media su producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tras la isquemia<sup>45</sup>.

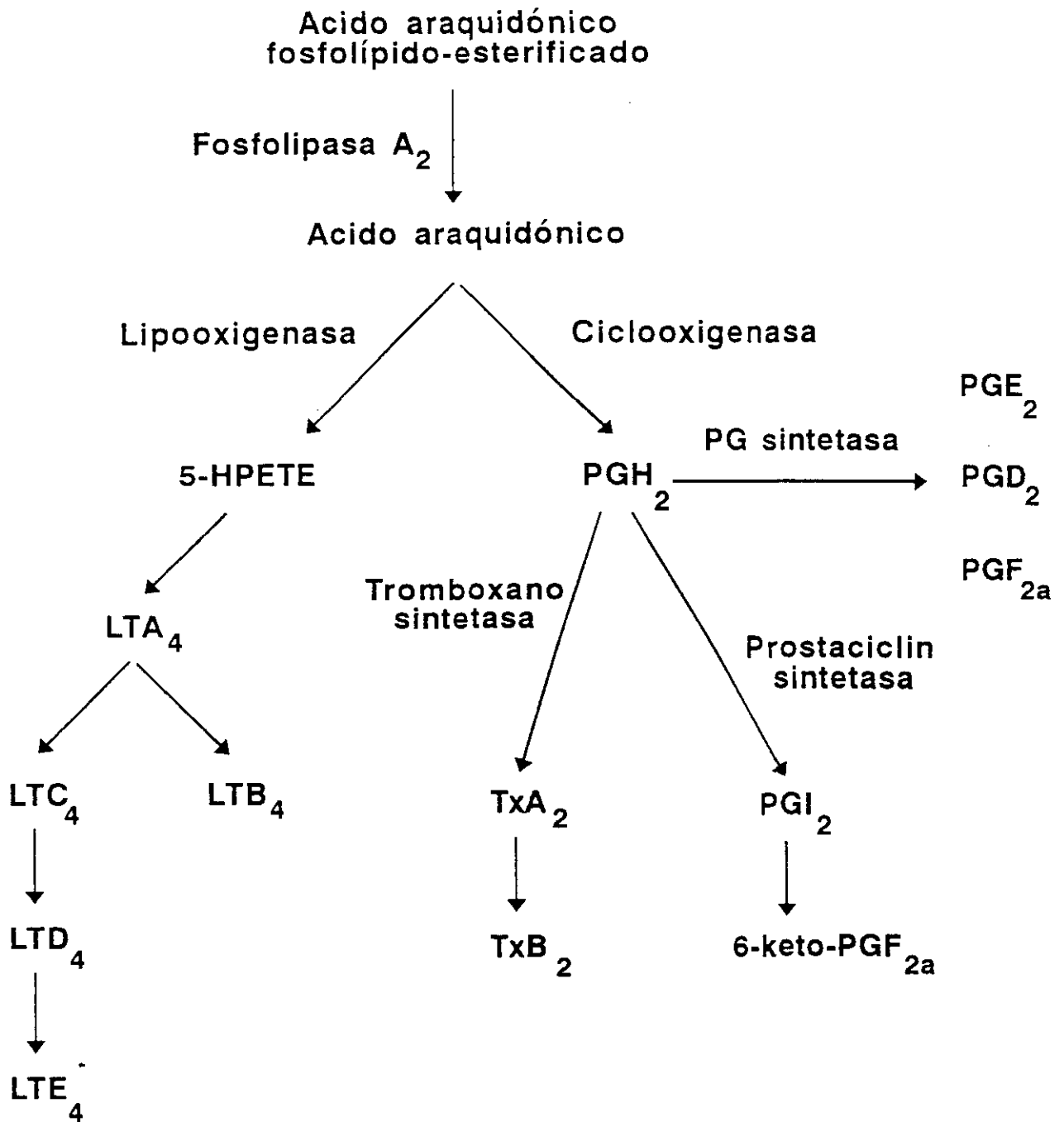


Fig. 4.- Cascada del ácido araquidónico mostrando los productos esenciales e intermedios.

En tercer lugar, leucotrienos y tromboxano afectan al flujo sanguíneo y, por tanto, la perfusión tisular por acción directa sobre la microvasculatura. Los leucotrienos pueden estimular la adhesión de los leucocitos al endotelio. En el endotelio lesionado se puede producir una activación del  $O_2^-$  produciendo NADPH oxidasa.

Los neutrófilos que se introducen en el tejido que ha sido reperfundido se activan al incrementarse la síntesis de metabolitos de oxígeno y enzimas proteolíticas, volviéndose más adhesivos para el endotelio. Estos neutrófilos pueden entonces producir lesión, al adherirse al endotelio, en dos sitios: esfínter precapilar y vénula postcapilar. Como los neutrófilos activados se vuelven más rígidos, no pueden modificarse lo suficiente como para pasar a través del esfínter precapilar. El resultado es que los capilares se obstruyen tras la reperfusión con la posible exacerbación de la lesión anóxica. Muchos neutrófilos se adhieren al endotelio en la vénula postcapilar. El mecanismo lesional de estos neutrófilos es debido a la secreción de enzimas proteolíticas tales como elastasa, probablemente junto con los productos de oxidación generados por los neutrófilos tales como HOCl y  $H_2O_2$ . Esto produce la lisis estructural de proteínas tales como elastina, incrementando la permeabilidad microvascular<sup>46</sup>.

La adhesión neutrófilo-endotelial produce un microambiente que permite altas concentraciones de agentes lesivos.

Por tanto, el incremento citosólico de  $Ca^{2+}$  tiene como consecuencia un aumento de la producción de  $O_2^-$  por ambas vías enzimáticas, xantinoxidasa y NADPH oxidasa. Estas reacciones no requieren Fe per se, y pueden acompañarse o no por una peroxidación de los lípidos iniciada por un radical perferil con consiguiente lesión de la

membrana celular, o por defectos de OH inducidos en ácidos nucleicos y proteínas, dependiendo de los niveles de  $O_2^-$  y Fe, así como de la disposición de los adecuados quelante de Fe.

Los efectos primarios y secundarios de los radicales de oxígeno forman una compleja red de reacciones sinérgicas interconectadas, cuyo resultado final es impredecible en un sistema complejo como el de una célula, un tejido o un organismo.

## **PREVENCION DE LA LESION CELULAR DURANTE EL PERIODO ISQUEMICO**

El pretratamiento de ratas con Clorpromacina treinta minutos antes de la inducción de isquemia, reduce la acumulación intracelular de iones de calcio durante el periodo isquémico y durante la reperfusión<sup>23</sup>. El mecanismo de protección depende de la prevención de la degradación de los fosfolípidos de membrana durante la isquemia y de la disfunción mitocondrial. Este efecto parece ser resultado de la hipotermia inducida por dicha droga.

La hipotermia se usa generalmente para proteger el hígado sometido a isquemia en el transplante, así como en otras situaciones para prevenir la lesión hepática durante la isquemia que se produce al realizar el clampaje del pedículo hepático (maniobra de Pringle) en situaciones tales como resección de ciertos tumores y traumatismos severos<sup>24</sup>.

La somatostatina ejerce, así mismo un efecto citoprotector que protege al hígado sometido a lesión por isquemia reperfusión<sup>47</sup>.

## **PROTECCION DEL HIGADO TRAS LA REPERFUSION**

El tratamiento de ratas con coenzima  $Q_{10}$  ( $Co Q_{10}$ )<sup>8,25,28</sup> previamente a la isquemia hepática, preserva, al parecer, la función mitocondrial, aunque su efecto beneficioso se debe a su acción como depredador de radicales libres previniendo la peroxidación de los lípidos de membrana. Casi idénticos resultados se han obtenido con otros depredadores de radicales libres tales como alfa tocoferol<sup>8,26</sup>, que actúa como antioxidante en la peroxidación de los lípidos.

El glutatión (GSH) es un importante depredador de radicales libres en el hígado. Cuando el contenido hepático en GSH se reduce por administración de dietilmaleato o por ayuno de 48 horas, la muerte celular es más extensa que en caso de hígados con alto contenido en GSH<sup>8,22,28</sup>. La administración de GSH a ratas un día antes de la isquemia hepática, acelera la resíntesis de ATP y disminuye la peroxidación de los lípidos durante la reperfusión.

Otra forma de prevenir la lesión por reperfusión es reducir la producción de radicales oxigenados. El alopurinol es un inhibidor de la xantinaoxidasa que probablemente actúa disminuyendo la producción de radicales oxigenados durante la reperfusión<sup>28,31</sup>.

El uso de metilprednisolona parece contribuir, así mismo, a la protección de los tejidos isquémicos debido a su acción como estabilizador de las membranas de los lisosomas. Su efecto beneficioso se produce durante la reperfusión del hígado isquémico<sup>28,29</sup>.



## MECANISMOS PROTECTORES CONTRA LA LESION POR REOXIGENACION

Los organismos vivientes están equipados con mecanismos eficientes por los que se protegen contra el efecto deletéreo de los metabolitos reactivos de oxígeno. En algunos casos hacen uso de los radicales de oxígeno, como por ejemplo en el caso de la movilización del Fe de la ferritina  $O_2^-$  dependiente. En otros casos, sin embargo, las células poseen poderosos mecanismos, enzimáticos y no enzimáticos por los que pueden liberarse o prevenir la formación de especies reactivas de oxígeno.

La SOD localizada en aquellos compartimentos celulares donde puede formarse  $O_2^-$  (mitocondrias y citosol), es generalmente reconocida como la llave enzimática responsable de la eliminación de este radical. La catalasa, varias peroxidasa, y glutathion reductasa destruyen  $H_2O_2$ . La glutathion reductasa se localiza en los mismos compartimentos celulares que la SOD y elimina el  $H_2O_2$  producida por SOD. La glutathion reductasa también reacciona con peróxidos orgánicos y por tanto puede jugar un importante papel en la regulación de la cascada del ácido araquidónico. También existe una fosfolípido hidroperóxido glutathion peroxidasa, aparentemente diseñada como instrumento en la detoxificación de los fosfolípidos de membrana peroxidados. Otra enzima que puede estar implicado en la reparación de la membrana es la fosfolipasa  $A_2$  que ataca preferentemente a los fosfolípidos de membrana peroxidados. Mecanismos reparadores similares existen para las lesiones oxidativas de DNA y proteínas<sup>5</sup>.

Dentro de los mecanismos protectores no enzimáticos contra los  $O_2$

derivados y otros radicales libres se incluyen alfa-tocoferol, beta-caroteno, retinol y ácido ascórbico. Recientemente el ácido úrico y la bilirrubina también han adquirido atención como antioxidantes. Así mismo, la forma reducida de ubiquinona puede servir como un antioxidante en mitocondrias y otras membranas biológicas.

La DT diaforasa es una flavoproteína dimérica ampliamente distribuida en los tejidos animales que asienta principalmente en el citosol y en menor cuantía en mitocondrias y retículo endoplasmático. Es la única entre las flavoproteínas conocidas que es una quinona reductasa transferidora de dos electrones y juega, por tanto, un papel importante en prevenir la reducción de un electrón de quinonas exógenas, por otras enzimas, a semiquinonas autooxidables y concomitante generación de  $O_2^{\cdot-}$ .

**VIA ARGININA:OXIDO NITRICO**

## **INTRODUCCION**

La demostración en 1.987 de la formación de Oxido Nítrico (NO) por un enzima en las células del endotelio vascular, abrió el camino a lo que ahora puede ser considerado un nuevo campo en la investigación biológica. El NO es el estimulador endógeno de la guanilato ciclasa soluble. Además, el NO es una molécula efectora liberada por macrófagos y otras células después de su activación inmunológica.

El NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por un enzima, la NO sintetasa<sup>98</sup>. Al parecer existen dos tipos de este enzima. Una es constitutiva, citosólica,  $Ca^{2+}$ /calmodulina dependiente, y libera NO en periodos cortos como respuesta al receptor o a estimulación física. El NO liberado por este enzima actúa por medio de un mecanismo de transducción produciendo varias respuestas fisiológicas. El otro enzima es producida después de la activación de los macrófagos, células endoteliales y otras células, por citoquinas, y una vez inducida, sintetiza NO en periodos largos. Este enzima es citosólico,  $Ca^{2+}$  independiente, requiere tetrahidrobiopterina así como otros cofactores y su inducción es inhibida por glucocorticoides. El único papel claramente establecido para este NO es el de una molécula citotóxica para microorganismos invasores y células tumorales. Es probable, sin embargo, que la liberación de NO por este enzima tenga otras consecuencias biológicas incluyendo vasodilatación patológica y lesión tisular<sup>48</sup>.

## **FACTOR DE RELAJACION DERIVADO DEL ENDOTELIO Y OXIDO NITRICO**

El tono del músculo liso vascular es regulado por una serie de agentes vasoactivos que pueden alcanzar la pared vascular desde el torrente sanguíneo o que pueden ser liberados en la pared vascular por las terminaciones nerviosas adrenérgicas, colinérgicas u otras.

En los últimos años se sugirió que algunas sustancias producidas por las propias células vasculares participan en la regulación del tono del músculo liso, y que el endotelio vascular es el responsable de la generación de estas sustancias<sup>49</sup>. En 1976, S. MONCADA y colaboradores<sup>50</sup> al estudiar el metabolismo del ácido araquidónico en la pared vascular, descubrieron la prostaciclina, un potente vasodilatador, que es generado preferentemente por el endotelio vascular y cuyo conocimiento contribuyó a esclarecer el papel de estas sustancias en distintas situaciones fisiopatológicas. En 1980 R.F. FURCHGOTT y J.V. ZAWADZKI<sup>51</sup> demostraron que la relajación vascular inducida por acetilcolina dependía de la existencia del endotelio, y existían evidencias de que este efecto era mediado por un lábil factor humoral al que denominaron factor de relajación derivado del endotelio (endotelium derived relaxing factor, EDRF).

Más tarde se demostró que el EDRF es responsable de la relajación de la pared arterial que inducen otras sustancias tales como sustancia P, adenín nucleótidos, trombina, el ionóforo del calcio A23187 y la bradicinina; además de otros estímulos como la hipoxia y la estimulación eléctrica. Sin embargo, existen otros agentes, como el péptido

natriurético auricular, los agonistas adrenérgicos beta y la prostaciclina, que inducen la relajación vascular por mecanismos independientes del endotelio<sup>48</sup>.

Los primeros estudios para identificar el EDRF estuvieron dirigidos hacia los metabolitos del ácido araquidónico. Así, se demostró que el EDRF era una sustancia distinta de la prostaciclina y otras prostaglandinas vasodilatadoras, ya que la relajación dependiente del endotelio se producía incluso en los tejidos tratados con indometacina<sup>52</sup>. R.J. GRYLEWSKI<sup>53</sup> demostró que el mecanismo por el que actúan las diferentes sustancias antagonistas del EDRF es la producción de aniones superóxido.

A. MULSCH y als.<sup>54</sup> demostraron que la liberación de EDRF por las células endoteliales cultivadas activa la guanilato ciclasa. Esto sugiere que el EDRF es capaz de difundir hasta el músculo liso vascular, y a través de la guanilato ciclasa, producir la relajación vascular. Esta activación produce un aumento del 3'-5' guanidín monofosfato cíclico (GMPc) tanto en el músculo liso como en las plaquetas, aumento que se asocia, por tanto, con la relajación dependiente del endotelio, así como con la inhibición de la agregación plaquetaria<sup>49</sup>.

Desde los primeros momentos se comprobó que la liberación de EDRF es un proceso calcio dependiente. La relajación dependiente del endotelio está más relacionada con el flujo de calcio transmembrana que con los niveles intracelulares de calcio.

La superóxido dismutasa (SOD) evita la degradación del EDRF y revierte la acción inhibidora de diversas sustancias sobre el EDRF<sup>55,56</sup>. Esto sugiere que el EDRF se destruye por aniones superóxido, pero no por otros radicales derivados del oxígeno.

Otros inhibidores del EDRF actúan por mecanismos diferentes; así, la hemoglobina se une a la molécula de EDRF y el azul de metileno actúa inhibiendo la guanilato ciclasa<sup>48</sup>. También se ha demostrado que las acciones del EDRF sobre preparaciones vasculares y plaquetas se potencian por la SOD y el citocromo c, y se inhiben por radicales  $Fe^{2+}$  y algunos componentes redox<sup>48,49</sup>.

En 1987 S. MONCADA y als.<sup>57,58</sup> demostraron que el EDRF es el NO. Estudiaron de forma comparativa los perfiles farmacológicos del EDRF y una preparación industrial de NO sobre segmentos vasculares y plaquetas. Descubrieron una acción relajadora similar, así como una disminución de su acción a la misma velocidad durante su paso por la cascada del bioanálisis. Además la vida media del NO es igual al del EDRF y ambos compuestos inhiben la agregación, inducen la desagregación e inhiben la adhesión plaquetaria<sup>59</sup>.

El NO puede medirse directamente como el producto quimioluminiscente de su reacción con el ozono<sup>57</sup>. Usando este método, S. MONCADA demostró que las concentraciones de bradicinina que inducen la liberación de EDRF en los cultivos de células endoteliales producen también una liberación de NO que reproduce la relajación de las preparaciones vasculares y la actividad antiagregante y antiadherente plaquetaria del EDRF.

Todas las evidencias farmacológicas y bioquímicas demuestran claramente que el EDRF es el NO y que cumple todos los criterios necesarios para ser clasificado como un mediador biológico.

El NO es una sustancia altamente inestable, que con rapidez se convierte en

$\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  en soluciones oxigenadas. Actúa solamente como resultado de la transferencia directa célula a célula, cuyas membranas atraviesa rápidamente, por lo que debe considerarse como una hormona local o sustancia paracrina más que como una hormona circulante<sup>ent</sup>.

Sin embargo, no debe excluirse la posibilidad de que otros mecanismos distintos a la liberación de NO, desempeñen algún papel en la relajación vascular dependiente del endotelio, ya que los mecanismos que realizan una misma función biológica suelen ser múltiples.



## **BIOSINTESIS**

Desde el descubrimiento de la liberación de NO por las células endoteliales, uno de los interrogantes más importantes ha sido el conocer el origen del NO.

S. MONCADA<sup>61</sup> ha demostrado que las células endoteliales cultivadas sintetizan NO del átomo del nitrógeno terminal del grupo guanido del aminoácido L-arginina; un aminoácido dibásico, catiónico, semiesencial con numerosas implicaciones en el metabolismo celular<sup>83</sup>. Sirve como un intermediario en el ciclo de la urea, como precursor de la biosíntesis de poliaminas, y con funciones inmunomoduladoras y secretorias. Esta reacción es específica, puesto que otros análogos de la L-arginina, incluido su isómero D, no son sustratos de ésta. Además uno de ellos, la N<sup>G</sup>monometil arginina (L-NMMA) produce una pequeña contracción dependiente del endotelio e inhibe la relajación y liberación de NO inducida por los vasodilatadores dependientes del endotelio como la acetilcolina. La L-arginina antagoniza todas las acciones de la L-NMMA. El coproducto de esta reacción es la L-citrulina, y su síntesis se inhibe también por la L-NMMA<sup>88</sup>.

Por tanto, un estímulo fisiológico, como por ejemplo, los niveles extracelulares de calcio, desencadena una serie de reacciones que conducen a la formación de NO a partir de la L-arginina que proviene de las proteínas séricas. El NO difunde a la célula diana produciendo la elevación de los niveles de GMPc<sup>93</sup>.

## **ACCIONES**

El NO puede actuar a través de dos formas:

A.- Como un mecanismo de transducción .

B.- Como una molécula efectora.

### **A.-Mecanismo de transducción.-**

Nuevos indicios en el campo de la comunicación intercelular se están dando a conocer en los últimos años. Hasta fechas recientes, los mediadores neuronales se creía que operaban de una forma altamente regulada, comenzando con la presíntesis, almacenamiento en vesículas y liberación en la hendidura sináptica para actuar sobre los específicos receptores de membrana. La generación de moléculas altamente difusibles tales como el NO, desafía estos preconceptos, y por tanto sería importante comprender los factores que confieren especificidad a sus acciones<sup>62</sup>.

La necesidad conceptual de una molécula más sustancial que sea responsable de las interacciones celulares es tal que ha sido reivindicada la existencia de compuestos que contienen NO para explicar las acciones del NO.

El NO no actúa estimulando un receptor en la membrana celular, sino que tiene una serie de blancos intracelulares, de los cuales el más estudiado es la guanilato ciclasa soluble<sup>63</sup>.

En el sistema cardiovascular el endotelio es el principal asiento del NO, que es derivado fisiológicamente y produce vasodilatación, de importancia clave en la

regulación del flujo sanguíneo y de la presión. El NO puede ser liberado también a partir de las terminaciones nerviosas no adrenérgicas y no colinérgicas, al menos en algunas regiones, y algunas formas de vasodilatación colinérgica pueden ser mediadas también por NO. Además la transmisión simpática puede ser modulada por NO, y ciertos mecanismos mediados por el NO en partes del cerebro tales como el nucleus tractus solitarius pueden estar implicados en la regulación de la presión sanguínea. Además el NO tiene otras funciones en el sistema cardiovascular que incluyen la regulación de la excreción de Na por el riñón.

Queda por clarificar el mecanismo por el que el NO es transferido desde los puntos de síntesis (endotelio vascular y terminaciones nerviosas) a la guanilato ciclasa soluble en los vasos del músculo liso, ya que la distancia y las dificultades que separan el endotelio vascular del lecho adventicial de la vasculatura del músculo liso son amplias y numerosas. Esto pone en evidencia la cuestión de si el NO atraviesa el espacio intracelular o si sólo es transferido directamente de célula a célula.

#### a.-Endotelio vascular.-

El EDRF es una sustancia humoral lábil que relaja el músculo liso vascular e inhibe la agregación y adhesión plaquetaria a través de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble. La naturaleza química del EDRF ha sido identificada como NO debido a que sus propiedades farmacológicas son idénticas. El NO es liberado desde las células endoteliales vasculares cultivadas y desde preparaciones vasculares en cantidades suficientes para explicar las acciones biológicas del EDRF.

Las células del endotelio vascular sintetizan NO a partir del nitrógeno guanidino terminal de la L-arginina<sup>64</sup>. La L-NMMA inhibe la síntesis de NO de una manera específica y dosis dependiente<sup>65</sup>. El coproducto de esta reacción es L-citrulina, cuya síntesis es también inhibida por la L-NMMA<sup>65</sup>. El enzima que sintetiza NO desde la L-arginina en estas células, denominada NO sintetasa, es citosólica y NADPH, Ca y calmodulina dependiente<sup>48</sup>.

En el sistema vascular hay un uso continuo de L-arginina para la generación de NO que juega un papel en el mantenimiento de la presión sanguínea. El marcado aumento de la presión arterial producido tras la inhibición de la síntesis de NO, confirma el hecho de que el NO es el nitrovasodilatador endógeno, y sugiere que una reducción en la síntesis de NO puede contribuir a la patogenia de la hipertensión arterial.

Pequeñas variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular alteran la producción de NO por el endotelio vascular. Esto indica que el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel crucial en la modulación del tono vascular y sugiere que pequeños cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular pueden ser relevantes en algunas formas de hipertensión, incluyendo eclampsia<sup>67</sup>.

#### *b.- Plaquetas.*

---

El NO actúa a través de un mecanismo de retroalimentación negativo para regular la agregación plaquetaria<sup>68</sup>. La agregación inducida por el colágeno va acompañada de un incremento intraplaquetario de los niveles de GMP cíclico. La L-arginina aumenta el nivel de GMPc inducido por el colágeno e inhibe la agregación. Se ha demostrado la

presencia en el citosol de las plaquetas de NO dependiente de L-arginina y NADPH, que es inhibido por L-NMMA. La formación de NO a partir de la L-arginina en el citosol de las plaquetas depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre.

La agregación plaquetaria *in vivo* probablemente está regulada por el NO intraplaquetario, así como por NO y prostaciclina liberados por el endotelio vascular. La inhibición de la adhesión plaquetaria inducida por el NO no está afectada por la prostaciclina, lo que indica que la adhesión plaquetaria es controlada por GMPc más que por AMPc<sup>69</sup>.

#### c.-Sistema nervioso.-

En 1.982 se identificó en el cerebro un activador endógeno de la guanilato ciclasa soluble que resultó ser la L-arginina<sup>48,70</sup>. Posteriormente se comprobó la presencia de la vía L-arginina:NO en el cerebro de la rata y se demostró la existencia de una NO sintetasa, que fue recientemente purificada comprobándose que era calmodulina dependiente<sup>71,71,72</sup>.

J. GARTHWAITE y als. comprobaron que la estimulación de las células del cerebelo de la rata con N-metil-D-aspartato (NMDA) induce una elevación de los niveles de GMPc, que se asocia con la liberación de un compuesto similar al EDRF<sup>72</sup>. El GMPc que se produce tras la estimulación con NMDA es estimulado por L-arginina y se inhibe con LNMA, lo que demuestra que esta respuesta es mediada por el NO.

Es posible que el NO juegue en el cerebro un importante papel en el desarrollo del aprendizaje y la memoria<sup>48</sup>.

La formación de NO puede mediar los efectos biológicos de otros neurotransmisores cuyas acciones se asocian con un aumento del GMPc<sup>48</sup>.

En el sistema nervioso periférico existen nervios, cuyo transmisor no es acetilcolina ni noradrenalina, que forman un componente importante de la innervación autonómica del músculo liso en el tracto gastrointestinal, vísceras pélvicas, vías aéreas y otros sistemas. Recientemente existen evidencias que indican que el NO puede ser el transmisor en al menos alguno de estos nervios y un modulador en otros<sup>48</sup>.

*d.-Otras células y tejidos .-*

Se ha comprobado la presencia de la vía L-arginina:NO en la corteza y la médula de la glándula adrenal. Esta síntesis de NO es también NADPH y  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente, igual que la del endotelio, plaquetas y cerebro<sup>46,98</sup>.

Se ha comprobado el papel del GMPc en la secreción de catecolaminas y en la esteroidogénesis, por lo que es posible que esta vía metabólica juegue un papel modulador en el control de la síntesis y secreción de hormonas por la glándula adrenal<sup>46,98</sup>.

## **B.- Molécula efectora.-**

Ha sido fácil aceptar que el NO, generado por las células fagocíticas, es citotóxica para microorganismos invasores y células cancerosas<sup>73</sup>. Las células del sistema reticuloendotelial liberan metabolitos reactivos del oxígeno como intermediarios, incluyendo  $O_2^-$  y por tanto la idea de radicales libres biológicamente activos no es ajena a este campo de investigación.

El NO, a diferencia de otras moléculas que son citotóxicas o citolíticas, ejerce estas acciones a través de selectivos blancos intracelulares. Se combina con centros Fe-S de enzimas del ciclo respiratorio y de la vía de síntesis del ADN. Estos enzimas incluyen aconitasa (ciclo de Krebs), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato:ubiquinona oxidorreductasa (complejo mitocondrial I), succinato:ubiquinona oxidorreductasa (complejo mitocondrial II) y ribonucleótidorreductasa (síntesis de ADN)<sup>49,73</sup>. La inhibición de estas enzimas es obviamente de dramáticas consecuencias para las células diana.

Existen evidencias de que el NO generado es citotóxico para las células que lo producen y las células vecinas. La producción de NO en las células de Kupffer, macrófagos, células endoteliales, células EMT-6 de adenocarcinoma, y fibroblastos es tóxico para ellas y las células adyacentes<sup>62</sup>.

Los hepatocitos, que fueron las primeras células no reticuloendoteliales en las que se comprobó la síntesis de NO<sup>74</sup>, son altamente resistentes a la acción citotóxica del mismo<sup>75</sup>. Esto sugiere que hay una diferente sensibilidad celular a las acciones tóxicas del NO y que unas células son más afectadas que otras.

T. R. BILLIAR<sup>75,92</sup> sugiere que el incremento en los niveles de GMPc pueden

no ser responsables de la citotoxicidad, al menos en los hepatocitos.

La sintetasa de NO expresada por el endotelio vascular y células del músculo liso es responsable de la hipotensión y de la hiporreactividad vascular del shock endotóxico, y la expresión de este enzima por el miocardio y el endocardio puede explicar la disfunción cardíaca específica que ocurre en estos casos<sup>62,96</sup>.

La vasodilatación en el shock es un mecanismo de defensa que se vuelve patológico al llegar a cierto punto. La citotoxicidad directa del NO puede acontecer por vasodilatación que, facilitando el flujo, favorece la supervivencia tisular. Esta puede ser la razón de los aparentemente contradictorios resultados del trabajo de T.R. BILLIAR<sup>75</sup> mostrando que, aunque el NO causa disfunción hepatocelular in vitro, la inhibición de su producción resulta en una lesión hepática in vivo. Esto indica que la producción de NO es a la vez protectora y lesiva, como sugieren los experimentos en shock endotóxico<sup>76</sup>.

NO y  $O_2^-$  generados por leucocitos activados pueden interactuar para cancelar la actividad biológica del NO<sup>77</sup>. Se ha demostrado que NO y  $O_2^-$  pueden reaccionar para formar peroxinitrito, el cual se descompone al ser protonado por potentes oxidantes tales como  $\cdot OH$  y  $NO_2^-$ . Es probable que en condiciones de activación celular inmunológica se produciría una interacción entre NO,  $O_2^-$ , y posiblemente otros reactivos intermediarios del oxígeno. La toxicidad inducida por NO puede ser causada por estos componentes resultantes.

La generación de NO por el enzima inducible es regulada por glucocorticoides y citoquinas<sup>94</sup>. Los glucocorticoides inhiben la inducción de la síntesis de NO sin afectar a ambos enzimas constitutiva e inducible. Esta propiedad puede explicar,



al menos en parte, algunas de las acciones tóxicas y terapéuticas de estos compuestos.

a.- Macrófagos.-

Una vía metabólica L-arginina dependiente contribuye a la actividad citotóxica de los macrófagos, incluyendo inhibición de la respiración mitocondrial, actividad aconitasa, y síntesis de DNA; y se produce a través de la inhibición de los enzimas que contienen Fe en las células diana<sup>90,91</sup>. Esta actividad, así como la generación de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ , son inhibidas por L-NMMA<sup>97</sup>. Esta vía parece jugar un papel en los efectos citotóxicos de los macrófagos sobre las células tumorales, protozoos y microbios<sup>73,89,95</sup>.

Esta síntesis de NO en los macrófagos difiere de la que se produce en las células endoteliales, plaquetas y cerebro en que no se detecta en células inactivadas y requiere síntesis proteica para su expresión<sup>78</sup>. La síntesis de NO por los macrófagos es citosólica y requiere L-arginina, NADPH y tetrahidrobiopterina, pero no  $\text{Ca}^{2+}$ .

b.- Neutrófilos.-

Se ha comprobado en estas células la presencia de una NO sintetasa similar a la que existe en los macrófagos<sup>48,70,87</sup>. La significación biológica de la producción de NO por los neutrófilos es desconocida. No existe evidencia de que el NO derivado de los neutrófilos juegue ningún papel en la actividad citotóxica de estas células. La liberación de NO puede ser un mecanismo para controlar los niveles de anión superóxido, que es también liberado por neutrófilos estimulados e inactiva al NO<sup>77</sup>.

*c.- Células de Kupffer y hepatocitos.-*

Las células de Kupffer de ratas, cultivadas con hepatocitos y estimuladas con lipoproteínas, inducen una significativa supresión de la síntesis total de proteínas por los hepatocitos, pero sólo cuando está presente la L-arginina en el medio<sup>73</sup>. Este efecto que requiere un período de inducción de varias horas, está asociado con la formación de  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , y citrulina tanto en las células de Kupffer como en los hepatocitos<sup>89,90</sup>. Este efecto es bloqueado con L-NMMA. El NO así formado es citotóxico porque suprime la síntesis proteica<sup>78</sup>.

El origen de la arginina para la síntesis de NO en el hígado no está claro, particularmente si tenemos en cuenta el bajo nivel de arginina intracelular<sup>84</sup>. La concentración intracelular de arginina en los hepatocitos es muy baja (5  $\mu\text{M}$ ) comparada con la concentración plasmática (50-100  $\mu\text{M}$ ), lo que sugiere que la sangre puede ser un importante origen de arginina para el hepatocito y que la capacidad de transporte de la membrana plasmática para la arginina puede controlar su nivel<sup>64</sup>.

La producción de NO por las células del parénquima hepático es estimulada por bacterias, endotoxinas y citoquinas y puede estar implicado en el daño hepatocelular asociado a sepsis<sup>85</sup>. Hay, además, crecientes evidencias que sugieren que, bajo ciertas circunstancias, el incremento en la producción de NO es responsable de los compromisos hemodinámicos que aparecen en el shock séptico.

El transporte de arginina por los hepatocitos humanos es mediado principalmente por el sistema de transporte  $\text{Na}^+$ -independiente y<sup>-</sup>. Los inhibidores de la NO sintetasa además de su capacidad para bloquear la producción intracelular de NO, también

bloquean la captación de la arginina a través de la membrana plasmática del hepatocito<sup>64</sup>.

*d.- Sistema vascular.-*

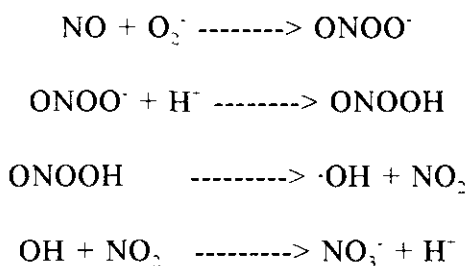
Hasta hace poco tiempo se creía que la única sintetasa de NO en la pared vascular era constitutiva  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente del endotelio. Sin embargo, recientemente se comprobó que las células endoteliales en cultivo expresan una NO sintetasa  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente tras la activación in vitro con LPS e IFN-gamma<sup>79</sup>.

*e.- Otras células y tejidos.-*

Se ha demostrado la presencia de una NO sintetasa inducible en células EMT-6 de adenocarcinomas de mamíferos y en fibroblastos estimulados con citoquinas.

## OXIDO NITRICO Y LESION POR REOXIGENACION

Se acepta en general que la alta reactividad del  $\cdot\text{OH}$  es la responsable de la lesión oxidativa en algunos tejidos, como el miocardio, y la formación de  $\cdot\text{OH}$  ocurre a través de la reacción de Haber-Weiss (Fenton) catalizada por  $\text{Fe}^{82}$ . J.S. BECKMAN y als.<sup>80</sup> han sugerido que la generación de  $\cdot\text{OH}$  a través de la reacción de Haber-Weiss puede ser limitada *in vivo*, y han propuesto que el NO reacciona con  $\text{O}_2^-$  en situaciones patológicas para producir especies citotóxicas a través de las siguientes reacciones bioquímicas<sup>82,86</sup>:



Esta reacción química puede verse como una vía alternativa de generación de  $\cdot\text{OH}$  durante la lesión por reoxigenación de los tejidos y está de acuerdo con el conocido efecto protector de la superóxido dismutasa<sup>80,81</sup>.

Es probable que la interacción entre superóxido y NO pueda ocurrir *in vivo* y se ha sugerido que el endotelio vascular tiene la capacidad para regular los efectos del NO generando superóxido<sup>86</sup>. En algunas situaciones patológicas, los macrófagos y neutrófilos, reclutados en el sitio de la lesión, pueden ser activados para producir superóxido y óxido nítrico como parte de la respuesta inflamatoria.

Estos datos podrían generar la hipótesis de que la lesión por reoxigenación estaría mediada, al menos parcialmente, por la vía L-arginina:NO previamente a la formación del anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y  $\cdot\text{OH}$ .

**ANATOMIA DEL HIGADO DE LA RATA WISTAR**

El hígado de la rata Wistar presenta dos características principales: la presencia de cuatro lóbulos separados por tres fisuras principales y la ausencia de vesícula biliar.

Al abrir el abdomen, los lóbulos medio y lateral izquierdo, que forman los dos lóbulos anteriores, están en primer plano bajo la pared abdominal y recubren los dos lóbulos dorsales, el lóbulo lateral derecho y el lóbulo caudado. Estos cuatro lóbulos están unidos por un eje parenquimatoso circundando la vena cava.

El lóbulo medio es el más anterior de los cuatro. Presenta una fisura en su cara anterior, donde se inserta el ligamento falciforme, que lo separa en dos partes desiguales.

El lóbulo lateral izquierdo presenta una hendidura en su cara posterior que corresponde al paso del esófago abdominal. Se encuentra parcialmente cubierto por el lóbulo medio y oculta completamente la parte anterior del lóbulo caudado.

El lóbulo lateral derecho está separado por una profunda fisura en dos partes iguales, una anterior y otra posterior. Cerca de la línea media presenta una protuberancia parenquimatosa, que es el lugar de inserción del ligamento hepatomesoduodenal.

El lóbulo caudado está dividido en dos partes por una fisura en la que discurre el esófago abdominal.

Los cuatro lóbulos están separados por tres fisuras principales: derecha, izquierda y dorsal, que junto a la presencia de otras tres fisuras incompletas: umbilical, frontal derecha y frontal izquierda, determinan los ocho segmentos siguientes:

- Segmento I.- Corresponde al lóbulo caudado, dividido por la fisura frontal izquierda.
- Segmento II.- Corresponde al lóbulo lateral izquierdo, separado del lóbulo caudado por la fisura principal dorsal.
- Segmentos III y IV .- Corresponden al lóbulo medio, separado del lóbulo lateral izquierdo por la fisura principal izquierda.
- Segmentos V y VIII.- Corresponden también al lóbulo medio y están separados de los segmentos III y IV por la fisura umbilical, que divide el lóbulo medio en dos lóbulos paramediales, el izquierdo que incluye los segmentos III y IV y el derecho que incluye los segmentos V y VIII.
- Segmentos VI y VII.- Corresponden al lóbulo lateral derecho, estando divididos por la fisura frontal derecha y separados del lóbulo medio por la fisura principal derecha.

El hilio hepático está formado por la vena porta, la arteria hepática y el conducto hepático. El árbol biliar es el más superficial de los elementos del hilio hepático y se origina en el segmento II, formándose por la unión de cuatro conductos que drenan el resto de los segmentos hepáticos.

La vena porta y sus ramas están situadas en la zona más profunda, ocupando la arteria hepática una situación intermedia entre los otros dos elementos. Describen una curva cóncava hacia la izquierda, distribuyendo sucesivamente sus ramas para los diferentes lóbulos.



Los ligamentos triangulares consisten en reforzamientos laterales de la reflexión peritoneal. El ligamento falciforme es sagital, con forma de media luna y se inserta en la cara anterior del lóbulo medio, en el diafragma y en la pared anterior abdominal. El ligamento hepatomesoduodenal tiene forma triangular con la base situada en la parte anterior de la aorta por encima del origen de la arteria mesentérica superior y a lo largo de la inserción del meso duodenal<sup>99</sup>.

## **PLANTEAMIENTOS GENERALES Y OBJETIVOS**

El desarrollo de la cirugía y los procedimientos anestésicos han permitido el abordaje hepático para el tratamiento de traumatismos y tumores, que necesitan de exclusión vascular temporal. Sin embargo la cirugía hepática se ha seguido viendo limitada por la lesión que se produce tras el período de isquemia temporal y la subsiguiente revascularización.

El avance en el tratamiento de ciertas hepatopatías desde la introducción del transplante hepático como arma terapéutica, ha permitido unos excelentes resultados al conseguir la supervivencia de pacientes que, hasta ese momento, estaban condenados irremisiblemente a un desenlace fatal de su enfermedad. Desde entonces se han incrementado progresivamente las investigaciones en todos los campos que rodean al transplante.

Uno de los problemas más graves que se han planteado es el mantenimiento de la viabilidad del injerto, evitando la lesión que se produce tras la reperusión postisquémica.

El conocimiento de los mecanismos íntimos de la lesión fisiopatológica que se produce tras un proceso de isquemia-reperusión, podría permitir mantener la viabilidad del órgano e impedir el daño celular que tiene lugar tras la revascularización postisquémica.

Nos hemos interesado en las modificaciones cuantitativas de los aminoácidos básicos que se producen tras períodos de isquemia parcial hepática y posterior reperfusión, como elementos integrados en la fisiopatología de la lesión por reperfusión. Las alteraciones en los niveles de Arginina, Lisina e Histidina podrían verse implicados como intermediarios en el metabolismo del daño hepático que se produce tras la revascularización postisquémica.

En los últimos años se han desarrollado múltiples líneas de investigación para estudiar el mecanismo por el que se produce la lesión postreoxigenación, prestándose especial atención a distintos aminoácidos, y en especial a la arginina como precursor del NO en la vía metabólica Arginina:NO.

## **OBJETIVOS**

**1.-** Determinación basal de los aminoácidos Arginina, Lisina e Histidina en un modelo experimental de isquemia-reperfusión hepática en ratas.

**2.-** Estudiar sus modificaciones cuantitativas tras períodos de isquemia-reperfusión variables.

**3.-** Comprobar si la función citoprotectora de SS14 se realiza a través de su influencia en la modificación de estos parámetros.

## **MATERIAL Y METODOS**

## **ANIMALES DE EXPERIMENTACION**

Se han utilizado 45 ratas Wistar machos del animalario de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Juan Canalejo de La Coruña. El peso de los animales ha sido de  $359 \pm 50$  gr.

Todos los animales incluidos en el estudio han permanecido en situaciones similares de estabulación, régimen luz/oscuridad, temperatura, humedad y tipo de alimentación.

Para la realización del estudio se ha respetado la normativa vigente sobre experimentación animal, aprobada en Real Decreto 223 del 14 de Marzo de 1.988 (B.O.E. 18 de Marzo de 1.988).

## **LABORATORIOS**

Las intervenciones quirúrgicas se realizaron en las instalaciones de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Juan Canalejo de La Coruña.

Los estudios de análisis de laboratorio se realizaron en el Servicio de Laboratorio del Hospital Juan Canalejo de La Coruña.

## **BOMBA DE PERFUSION**

Se utilizó una bomba de perfusión de flujo regulable modelo Harvard apparatus syringe infusion pump 22 en la perfusión de Somatostatina a través de la vena yugular.

## **PRODUCTOS UTILIZADOS**

Clorhidrato de Ketamina (Ketolar, Lab. Parke-Davis). Su composición por ml es la siguiente: 50 mgr de clorhidrato de ketamina, 0,1mgr de cloruro de femerol y 1ml de agua.

Atropina (Atropina, Lab. Braun). Ampollas de 1 mgr/ml.

Diazepan (Lab. Prodes). Ampollas de 5 mgr/ml.

Heparina al 1% (Lab. Leo).

En la serie de perfusión se administró a los animales SS-14 (Somiatón, Lab. Serono). Ampollas de 2ml con 250 mcgr de principio activo.



## **PREPERACION Y REALIZACION DEL EXPERIMENTO**

Desde 18 horas previas a la intervención los animales sólo tuvieron acceso al agua.

La anestesia fue igual para todos, consistiendo en la inyección intraperitoneal de una solución conteniendo Ketamina a dosis de 62,5 mgr/Kgr, Diazepán 5 mgr/Kgr y Atropina 0,25 mgr/Kgr.

Tras la anestesia a los animales se les rasuró la fosa supraclavicular izquierda, donde se disecó la vena yugular y se extrajo 1 ml de sangre que se catalogó como suero basal, tras lo cual los animales retornaron a sus jaulas.

Entre una y dos semanas más tarde se procedió a una nueva anestesia y tras inyectar 15 UI de Heparina por cada 100 gr de peso a través de la vena dorsal del pene, se rasuró la pared abdominal y se realizó una laparotomía transversa de 5-6 cm de longitud. Se identificó el pedículo vascular del lóbulo lateral derecho colocando una pinza vascular en dicho pedículo y procediendo a isquemia de 90 minutos, transcurridos los cuales se retiró la pinza permitiendo la reperfusión durante el primer minuto y a los 15, 30 y 60 minutos, según los grupos utilizados (Fig. 5).

Se estableció un primer grupo de supervivencia para comprobar que la lesión hepática no afectaba a la viabilidad de los animales y que la lesión era totalmente reversible, sin que los resultados se vieran sesgados por factores ajenos a la propia isquemia-reperfusión.

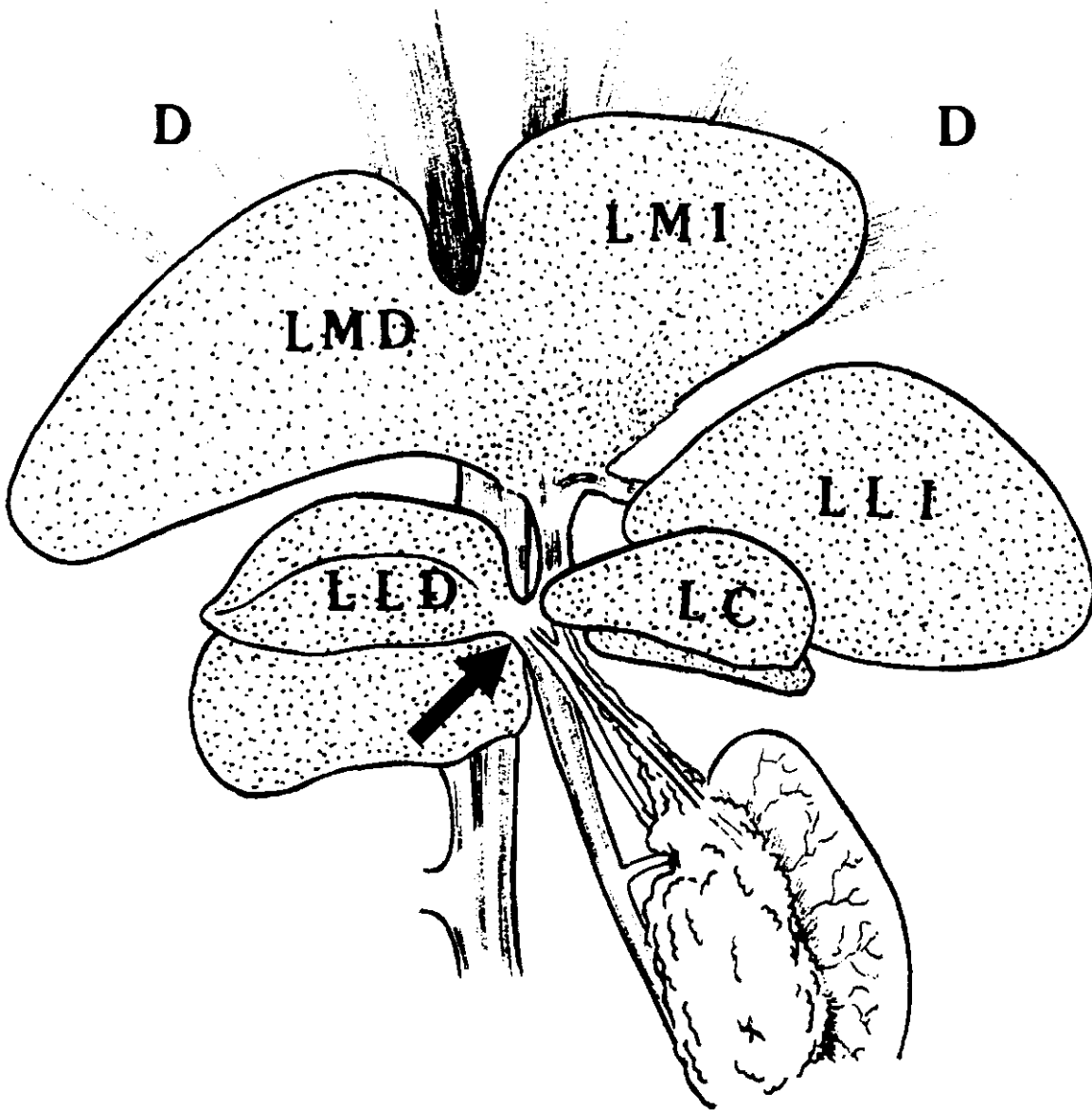


Fig. 5.- Lugar de colocación del clamp en el pedículo del lóbulo hepático derecho del hígado de la rata Wistar.

En la serie de perfusión se realizó cateterización de la vena yugular derecha con un venocath del número 18 por el que se administró SS-14 a la dosis de 2 microgramos/h a una velocidad de 0,1 ml/h comenzando 30 minutos antes de la intervención y manteniéndola hasta el final de la perfusión.

Al término de la perfusión se extrajo 1ml de sangre de la vena cava inferior.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 2.500 r.p.m. durante 5 minutos y el plasma se congeló a -20°C.

### **PARAMETROS VALORADOS**

Se han valorado los siguientes parámetros:

- Arginina.
- Lisina.
- Histidina.

La técnica de valoración ha sido por Cromatografía de intercambio iónico, consistente en separar las moléculas de soluto basándose en las diferencias de comportamiento ácido-base (Technicon TSM). Para este proceso la columna se llena con una resina sintética que contiene grupos cargados fijos. Existen dos clases principales de resina de intercambio iónico: intercambiadores catiónicos e

intercambiadores aniónicos. Los aminoácidos se separan habitualmente mediante columnas de intercambio catiónica rellenas con partículas sólidas de una resina de poliestereo sulfonada que se ha equilibrado previamente con una disolución de NaOH, de tal forma que sus grupos sulfónicos ácidos se hallen totalmente cargados con  $\text{Na}^+$ . Esta forma de resina es la forma sódica; la resina puede prepararse también en forma protonizada o forma hidrogenada, mediante lavado con ácido. A la forma sódica de la resina lavada se le añade una disolución ácida ( $\text{pH}=3$ ) de la mezcla de aminoácidos; a dicho pH los aminoácidos se encuentran principalmente en forma de cationes, con carga positiva neta. Los aminoácidos catiónicos tienden a desplazar algunos de los iones sodio ligados a las partículas de resina; la cantidad de desplazamiento variará ligeramente entre los distintos aminoácidos a causa de las pequeñas diferencias en el grado de ionización. A  $\text{pH}=3,0$  los aminoácidos más básicos (lisina, arginina e histidina) se unirán a la resina muy estrechamente por fuerzas electrostáticas, y los más ácidos serán los que se unan menos. A medida que se aumenta gradualmente el pH y la concentración de  $\text{ClNa}$  del medio eluyente acuoso, los aminoácidos descienden en la columna a velocidades diferentes y pueden recogerse en muchas fracciones pequeñas. Las diversas fracciones pueden analizarse cuantitativamente mediante la reacción de la ninhidrina. Los aminoácidos más aniónicos aparecen primeramente y los más catiónicos (arginina, lisina e histidina) posteriormente. A partir de los datos se construye una curva de elución. El procedimiento analítico completo ha sido automatizado, de modo que la elución, la recogida de las fracciones, el análisis de cada fracción y los datos de registro son

elaborados automáticamente mediante un aparato denominado analizador de aminoácidos.

## **PROTOCOLO DE TRABAJO**

Hemos realizado un primer grupo de control de supervivencia y a continuación se han establecido dos series en las que los animales de experimentación fueron divididos en cuatro grupos basados en los distintos tiempos de reperfusión.

En la primera serie se realizó isquemia y reperfusión del lóbulo hepático derecho sin perfusión con Somatostatina, mientras que en la segunda todos los animales de cada grupo recibieron una perfusión de Somatostatina (SS-14) desde media hora antes de la isquemia hasta el fin de la reperfusión.

### **GRUPO 0 (n=5) -**

Se realizó isquemia del lóbulo hepático derecho durante 90 minutos y posterior reperfusión, retornando a los animales a sus jaulas para comprobar supervivencia durante un mes.

### **SIN PERFUSION.-**

### **GRUPO I (n=5) -**

Tras anestesia se extrajo 1ml de sangre para determinaciones de aminoácidos en estado basal. Entre una y dos semanas más tarde se realizó isquemia del lóbulo hepático derecho durante 90 minutos, permitiendo a continuación la reperfusión y procediendo inmediatamente a la toma de 1ml de sangre de la vena

cava inferior.

GRUPO II (n=5).-

Se utilizó el mismo procedimiento que en el grupo I, pero la reperfusion fue de 15 minutos.

GRUPO III (n=5).-

Se siguió el mismo procedimiento que en los grupos anteriores, pero la reperfusion duró 30 minutos.

GRUPO IV (n=5).-

La reperfusion, tras isquemia del lóbulo hepático derecho, duró 60 minutos.

**PERFUSION CON SOMATOSTATINA.-**

Se cateterizó la vana yugular derecha por la que se perfundió SS-14 media hora antes de la intervención a dosis de 2 microgramos/hora a una velocidad de 0,1 ml/h y se mantuvo durante un periodo de isquemia de 90 minutos y durante todo el tiempo que duró la reperfusion.

Los grupos establecidos fueron los mismos que en la serie sin perfusion,

basados en los diferentes tiempos de reperfusión. A todos los animales se les realizó previamente una determinación de aminoácidos en estadio basal.

GRUPO I (n=5).- Isquemia de 90 minutos y reperfusión inmediata.

GRUPO II (n=5).- Isquemia de 90 minutos y reperfusión durante 15 minutos.

GRUPO III (n=5).- Isquemia de 90 minutos y reperfusión durante 30 minutos.

GRUPO IV (n=5).- Isquemia de 90 minutos y reperfusión durante 60 minutos.

## **METODO ESTADISTICO**

El estudio estadístico se realizó mediante el programa para PC RSIGMA<sup>R</sup>. La comparación de medias se realizó mediante la t de STUDENT, considerándose significativos los valores a partir de  $p < 0,05$ .



## **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos en los distintos grupos prefijados en el capítulo de Material y Métodos de este estudio se registran en las tablas I a XXX.

Todos los animales del grupo de supervivencia, a los que se realizó isquemia de 90 minutos y se les controló para comprobar su evolución natural, sobrevivieron.

Hemos calculado la media, desviación típica (DT), valor mínimo (Min), valor máximo (Máx), coeficiente de varianza (CV) y el error estadístico de la media (EEM) para los distintos aminoácidos en cada grupo de cada serie (Tablas XXXI a XXXIV).

Posteriormente se han comparado las medias de los resultados basales y tras isquemia-reperfusión en ambas series (B, Bss, I-R, I-Rss), así como las medias de los resultados basales y tras isquemia-reperfusión en cada una de las dos series, para los distintos aminoácidos (Tablas XXXV a XXXVIII).

A continuación se han comparado las medias de los resultados tras isquemia-reperfusión entre los distintos grupos de cada serie (Tabla XXXIX).

Se ha comprobado una disminución drástica de la arginina desde los primeros momentos de la perfusión y un incremento de los niveles de lisina e histidina en ambas series (Figuras 6 a 17).

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	68,23	10
2	73,35	10
3	87,63	38,01
4	76,25	34,10
5	69,73	25,10

TABLA I.- Arginina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Grupo I.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	52,07	0
2	115,34	0
3	76,32	0
4	102,42	0
5	130,28	0

TABLA II.- Arginina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Grupo II.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	80,99	0
2	60,79	0
3	88,21	0
4	61,82	0
5	51,43	0

TABLA III.- Arginina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Grupo III.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	87,14	0
2	124,01	0
3	94,11	0
4	89,97	0
5	119,94	0

TABLA IV.- Arginina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Grupo IV.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	322,73	416,94
2	282,96	383,65
3	272,95	396,91
4	292,37	402,45
5	396,22	605,54

TABLA V.- Lisina e Isquemia-reperfusion, micromoles/l. Grupo I.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	378,70	620,32
2	344,52	612,89
3	335,00	725,85
4	426,51	1032,28
5	409,89	723,59

TABLA VI.- Lisina e Isquemia-reperfusion, micromoles/l. Grupo II.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	391,27	618,79
2	362,41	675,52
3	221,11	571,47
4	461,22	596,61
5	214,27	489,83

TABLA VII.- Lisina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Grupo III.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	152,58	428,17
2	335,64	648,14
3	260,00	581,48
4	288,03	505,15
5	262,27	522,51

TABLA VIII.- Lisina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Grupo IV.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	96,02	109,72
2	161,33	181,97
3	89,07	108,15
4	172,93	188,05
5	115,93	122,09

TABLA IX.- Histidina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Grupo I.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	284,19	480,29
2	180,45	448,62
3	274,59	475,93
4	203,90	471,04
5	175,29	496,47

TABLA X.- Histidina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Grupo II.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	223,68	555,91
2	171,94	389,22
3	186,79	354,69
4	215,94	305,21
5	167,10	341,95

TABLA XI.- Histidina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Grupo III.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	93,56	325,90
2	129,77	496,28
3	113,08	529,45
4	137,48	414,28
5	132,00	363,97

TABLA XII.- Histidina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Grupo IV.



Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	90,28	17,06
2	72,46	13
3	83,06	25,97
4	78,24	33,82
5	67,11	23,51

TABLA XIII.- Arginina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Perfusión con Somatostatina. Grupo I.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	62,17	0
2	95,43	0
3	83,32	0
4	71,67	0
5	121,54	0

TABLA XIV.- Arginina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Perfusión con Somatostatina. Grupo II.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	72,00	0
2	151,64	0
3	78,64	0
4	112,98	0
5	82,95	0

TABLA XV.- Arginina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Perfusión con Somatostatina. Grupo III.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	74,18	0
2	94,08	0
3	65,22	0
4	69,73	0
5	107,16	0

TABLA XVI.- Arginina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Perfusión con Somatostatina. Grupo IV.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	352,27	601,81
2	346,22	413,67
3	299,08	396,71
4	274,31	423,29
5	401,32	513,28

TABLA XVII.- Lisina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Perfusión con Somatostatina. Grupo I.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	322,12	768,43
2	391,43	645,07
3	293,55	892,31
4	378,72	913,24
5	451,41	606,77

TABLA XVIII.- Lisina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Perfusión con Somatostatina. Grupo II.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	257,21	417,71
2	332,33	634,78
3	222,63	543,35
4	276,51	477,78
5	235,38	382,87

TABLA XIX.- Lisina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Perfusión con Somatostatina. Grupo III.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	273,18	432,10
2	293,82	519,21
3	364,72	413,63
4	269,13	457,81
5	207,16	602,15

TABLA XX.- Lisina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Perfusión con Somatostatina. Grupo IV.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	102,55	167,83
2	164,69	161,72
3	194,39	196,71
4	94,44	133,29
5	102,82	105,19

TABLA XXI.- Histidina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Perfusión con Somatostatina. Grupo I.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	155,52	437,64
2	239,38	435,57
3	198,32	471,22
4	251,17	424,93
5	287,33	477,62

TABLA XXII.- Histidina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Perfusión con Somatostatina. Grupo II.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	181,69	302,91
2	253,86	460,45
3	178,93	317,41
4	131,14	365,68
5	200,89	327,51

TABLA XXIII.- Histidina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Perfusión con Somatostatina. Grupo III.

Nº ANIMAL	SUERO BASAL	SUERO I-R
1	187,13	408,18
2	126,45	421,12
3	134,89	504,13
4	132,11	381,15
5	98,14	403,95

TABLA XXIV.- Histidina e Isquemia-reperfusión, micromoles/l. Perfusión con Somatostatina. Grupo IV.

GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III		GRUPO IV	
SB	SIR	SB	SIR	SB	SIR	SB	SIR
68,23	10	52,07	0	80,99	0	87,14	0
73,35	10	115,34	0	68,79	0	124,01	0
87,63	38,01	76,32	0	88,21	0	94,11	0
76,25	34,10	102,42	0	61,82	0	89,97	0
69,73	25,10	130,28	0	51,43	0	119,94	0

TABLA XXV.- Arginina basal y tras isquemia-reperfusion en la serie sin perfusión.

GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III		GRUPO IV	
SB	SIR	SB	SIR	SB	SIR	SB	SIR
90,28	17,06	62,17	0	72,00	0	74,18	0
72,46	13	95,43	0	151,64	0	94,08	0
83,06	25,97	83,32	0	78,64	0	65,22	0
78,24	33,82	71,67	0	112,98	0	69,73	0
67,11	23,51	121,54	0	82,95	0	107,16	0

Tabla XXVI.- Arginina basal y tras isquemia-reperfusion. Perfusión con Somatostatina.

GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III		GRUPO IV	
SB	SIR	SB	SIR	SB	SIR	SB	SIR
322,73	416,94	378,70	620,32	391,27	618,79	152,58	428,17
282,96	383,65	344,52	612,89	362,41	675,52	335,64	648,14
272,95	396,91	335,00	725,85	221,11	571,47	260,00	581,48
292,37	402,45	426,51	1032,28	461,22	596,61	288,03	505,15
396,22	605,54	409,89	723,59	214,27	489,83	262,27	522,51

TABLA XXVII.- Lisina basal y tras isquemia-reperfusión en la serie sin perfusión.

GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III		GRUPO IV	
SB	SIR	SB	SIR	SB	SIR	SB	SIR
352,27	601,81	322,12	768,43	257,21	417,71	273,18	432,10
346,22	413,67	391,43	645,07	332,33	634,78	293,82	519,21
299,08	396,71	293,55	892,31	222,63	543,35	364,72	413,63
274,31	423,29	378,72	913,24	276,51	477,78	269,13	457,81
401,32	513,28	451,41	606,77	235,38	382,87	207,16	602,15

Tabla XXVIII.- Lisina basal y tras isquemia-reperfusión. Perfusión con Somatostatina.



GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III		GRUPO IV	
SB	SIR	SB	SIR	SB	SIR	SB	SIR
96,02	109,72	284,19	480,29	223,68	555,91	93,56	325,90
161,33	181,97	180,45	448,62	171,94	389,22	129,77	496,28
89,07	108,15	274,59	475,93	186,79	354,69	113,08	529,45
172,93	188,05	203,90	471,04	215,94	305,21	137,48	414,28
115,93	122,09	175,29	496,47	167,10	341,95	132,00	363,97

TABLA XXIX.- Histidina basal y tras isquemia-reperfusión en la serie sin perfusión.

GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III		GRUPO IV	
SB	SIR	SB	SIR	SB	SIR	SB	SIR
102,55	167,83	155,52	437,64	181,69	302,91	187,13	408,18
164,69	161,72	239,38	435,57	253,86	460,45	126,45	421,12
194,39	196,71	198,32	471,22	178,93	317,41	134,89	504,13
94,44	133,29	251,17	424,93	131,14	365,68	132,11	381,15
102,82	105,19	287,33	477,62	200,89	327,51	98,14	403,95

Tabla XXX.- Histidina basal y tras isquemia-reperfusión. Perfusión con Somatostatina.

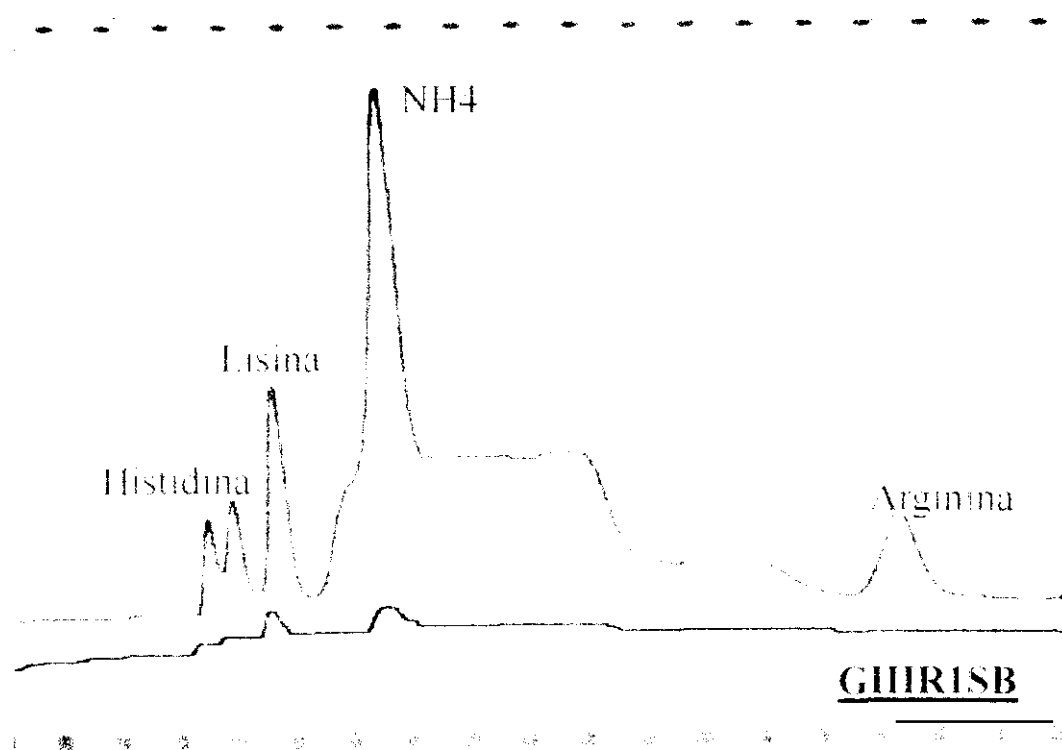


Fig. 6.- Cromatografía de intercambio iónico. Determinación de arginina, lisina e histidina en suero basal.

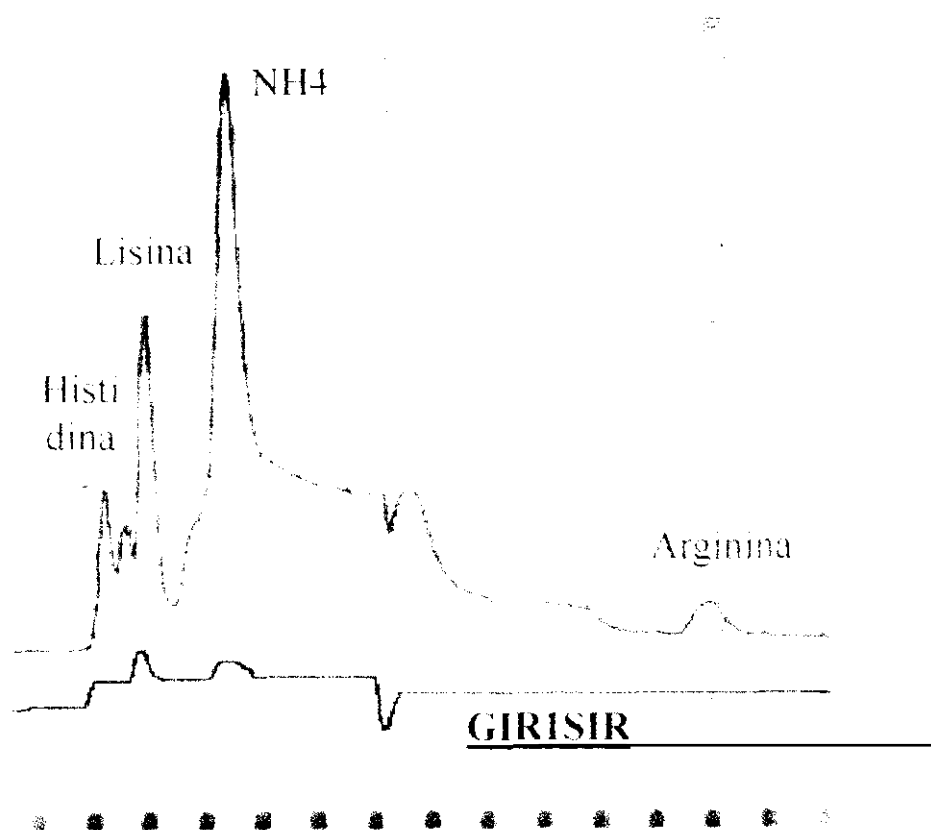


Fig. 7.- Cromatografía de intercambio iónico. Determinación de arginina, lisina e histidina tras la reperusión inmediata.

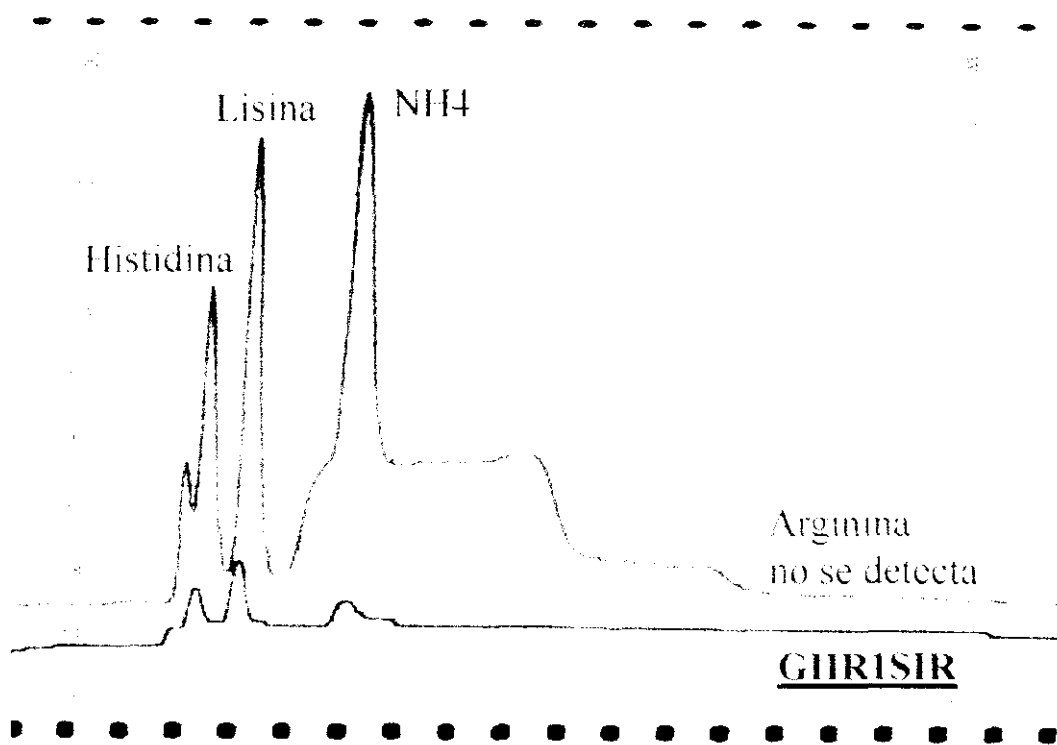


Fig. 8.- Cromatografía de intercambio iónica. Determinación de arginina, lisina e histidina a los 15 minutos de reperusión.



Fig. 9.- Cromatografía de intercambio iónico. Determinación de arginina, lisina e histidina a los 30 minutos de reperusión.

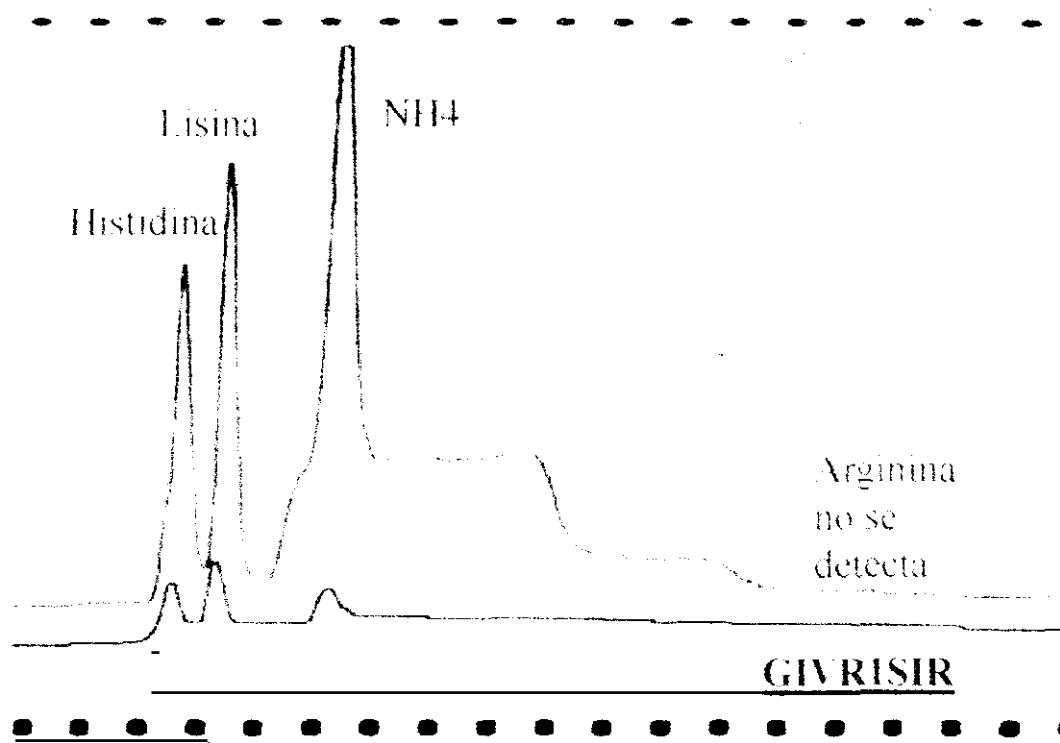


Fig. 10 - Cromatografía de intercambio iónico. Determinación de arginina, lisina e histidina a los 60 minutos de reperusión.

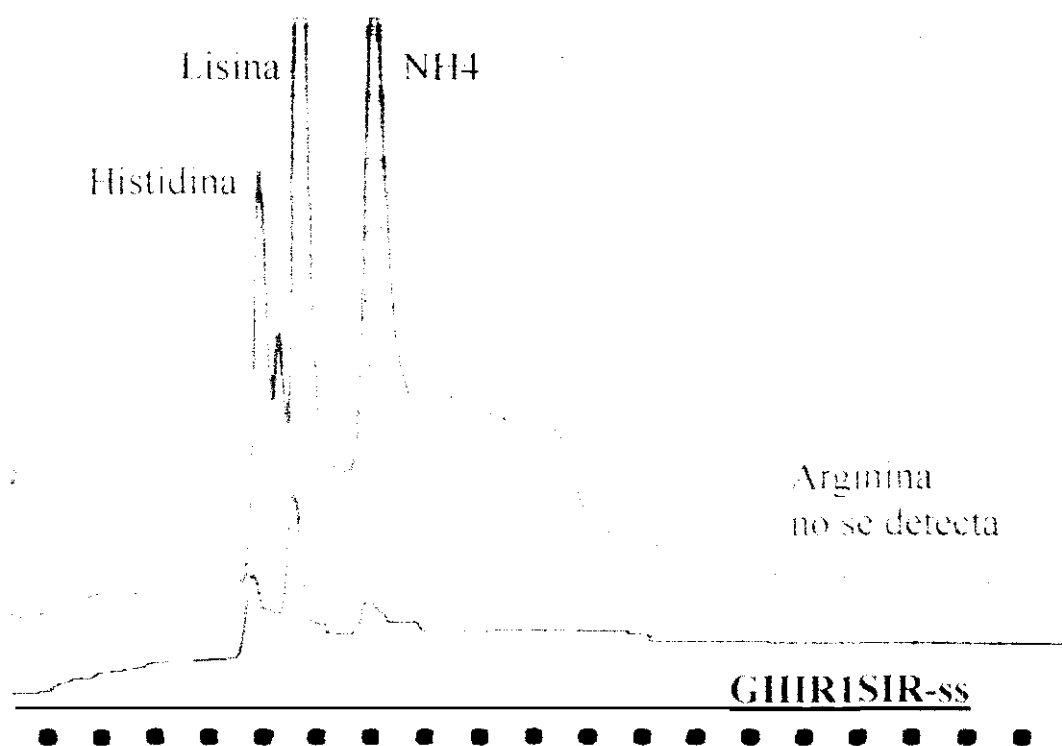


Fig. 11 - Cromatografía de intercambio iónico. Determinación de arginina, lisina e histidina a los 30 minutos de reperusión tras perfusión continua con SS14.

ARGININA	SIN	SS14	PERFUSION	SS14
	B	I-R		I-R
<b>MEDIA</b>	75,078	23,442	78,23	22,672
<b>DT</b>	7,6935	13,1334	9,0205	8,0762
<b>Min</b>	68,23	10	67,11	13
<b>Max</b>	87,63	38,01	90,28	33,82
<b>CV</b>	10,473	56,025	11,5308	35,6218
<b>EEM</b>	3,4406	5,8734	4,0341	3,6118

LISINA	SIN	SS14	PERFUSION	SS14
	B	I-R		I-R
<b>MEDIA</b>	313,446	441,098	334,64	469,752
<b>DT</b>	49,878	92,6975	49,4858	86,5636
<b>Min</b>	272,95	383,65	274,31	396,71
<b>Max</b>	396,22	605,54	401,32	601,81
<b>CV</b>	15,9128	21,0152	14,7878	18,4275
<b>EEM</b>	22,3061	41,4556	22,1307	38,7124

HISTIDINA	SIN	SS14	PERFUSION	SS14
	B	I-R		I-R
<b>MEDIA</b>	127,056	141,996	131,778	152,948
<b>DT</b>	38,1087	39,6939	44,9734	34,9314
<b>Min</b>	89,07	108,15	94,44	105,19
<b>Max</b>	172,93	188,05	194,39	196,71
<b>CV</b>	29,9936	27,9543	34,1282	22,8387
<b>EEM</b>	17,0427	17,7517	20,1127	15,6218

Tabla XXXI.- Estadística básica del Grupo I.



ARGININA	SIN	SS14	PERFUSION	SS14
	B	I-R	B	I-R
<b>MEDIA</b>	95,286	0	86,826	0
<b>DT</b>	31,2449	0	23,0706	0
<b>Min</b>	52,07	0	62,17	0
<b>Max</b>	130,28	0	121,54	0
<b>CV</b>	32,7906	0	26,571	0
<b>EEM</b>	13,9731	0	10,3175	0

LISINA	SIN	SS14	PERFUSION	SS14
	B	I-R	B	I-R
<b>MEDIA</b>	378,924	742,986	367,446	765,164
<b>DT</b>	39,8005	170,538	61,7806	139,2969
<b>Min</b>	335	612,89	293,55	606,67
<b>Max</b>	426,51	1032,28	451,41	913,24
<b>CV</b>	10,5036	22,9531	16,8135	18,2048
<b>EEM</b>	17,7993	76,2669	27,6291	62,2955

HISTIDINA	SIN	SS14	PERFUSION	SS14
	B	I-R	B	I-R
<b>MEDIA</b>	223,684	474,47	226,344	449,396
<b>DT</b>	52,0936	17,3204	50,7616	23,4565
<b>Min</b>	175,29	448,62	155,52	424,93
<b>Max</b>	284,19	496,97	287,33	477,62
<b>CV</b>	23,2889	3,6505	22,4267	5,2196
<b>EEM</b>	23,297	7,7459	22,7013	10,4901

Tabla XXXII.- Estadística básica del Grupo II.

ARGININA	SIN	SS14	PERFUSION	SS14
	B	I-R	B	I-R
<b>MEDIA</b>	70,248	0	99,642	0
<b>DT</b>	14,708	0	33,0359	0
<b>Min</b>	51,43	0	72	0
<b>Max</b>	88,21	0	151,64	0
<b>CV</b>	20,9372	0	33,1546	0
<b>EEM</b>	6,5776	0	14,7741	0

LISINA	SIN	SS14	PERFUSION	SS14
	B	I-R	B	I-R
<b>MEDIA</b>	330,056	590,444	264,852	471,298
<b>DT</b>	108,7124	68,1224	42,9742	97,7761
<b>Min</b>	214,27	489,83	222,63	382,87
<b>Max</b>	461,22	675,52	332,33	634,78
<b>CV</b>	32,9376	11,5375	16,2258	20,7461
<b>EEM</b>	48,6177	30,4653	19,2187	43,7268

HISTIDINA	SIN	SS14	PERFUSION	SS14
	B	I-R	B	I-R
<b>MEDIA</b>	193,09	389,396	189,302	354,792
<b>DT</b>	25,5947	97,8134	44,3011	63,4737
<b>Min</b>	167,10	305,21	131,14	302,91
<b>Max</b>	223,68	555,91	253,86	460,45
<b>CV</b>	13,2553	25,1193	23,4024	17,8904
<b>EEM</b>	11,4463	43,7435	19,8121	28,3863

Tabla XXXIII.- Estadística básica del Grupo III.

ARGININA	SIN	SS14	PERFUSION	SS14
	B	I-R		I-R
<b>MEDIA</b>	103,034	0	82,084	0
<b>DT</b>	17,5266	0	17,8339	0
<b>Min</b>	87,14	0	65,22	0
<b>Max</b>	124,01	0	107,16	0
<b>CV</b>	17,0105	0	21,7291	0
<b>EEM</b>	7,8381	0	7,9756	0

LISINA	SIN	SS14	PERFUSION	SS14
	B	I-R		I-R
<b>MEDIA</b>	259,704	537,09	281,602	484,98
<b>DT</b>	67,1767	82,763	56,6259	76,6907
<b>Min</b>	152,58	428,17	207,16	413,63
<b>Max</b>	375,64	648,14	364,72	602,15
<b>CV</b>	25,8667	15,4095	20,1085	15,8132
<b>EEM</b>	30,0424	37,0128	25,3239	34,2971

HISTIDINA	SIN	SS14	PERFUSION	SS14
	B	I-R		I-R
<b>MEDIA</b>	121,178	425,976	135,744	423,706
<b>DT</b>	17,9236	86,0905	32,2292	47,2151
<b>Min</b>	93,56	325,9	98,14	381,15
<b>Max</b>	137,48	529,45	187,13	504,13
<b>CV</b>	14,7912	20,2102	23,7427	11,1434
<b>EEM</b>	8,0157	38,5008	14,4134	21,1153

Tabla XXXIV.- Estadística básica del Grupo IV.

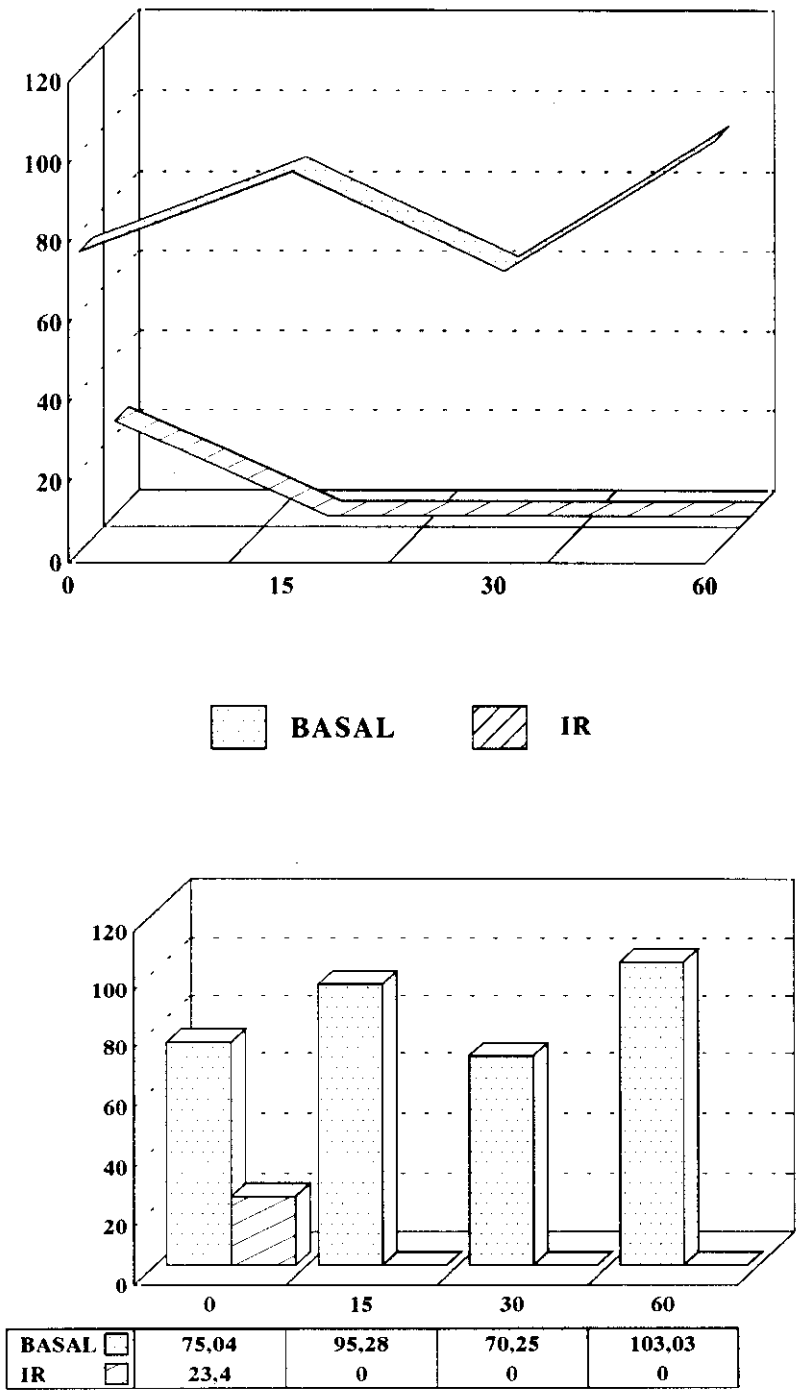


Fig. 12.- Arginina. Serie sin Somatostatina.

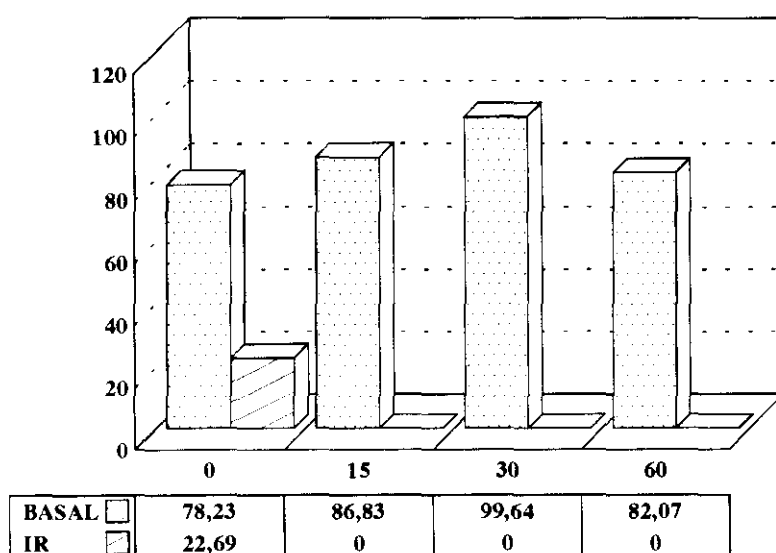
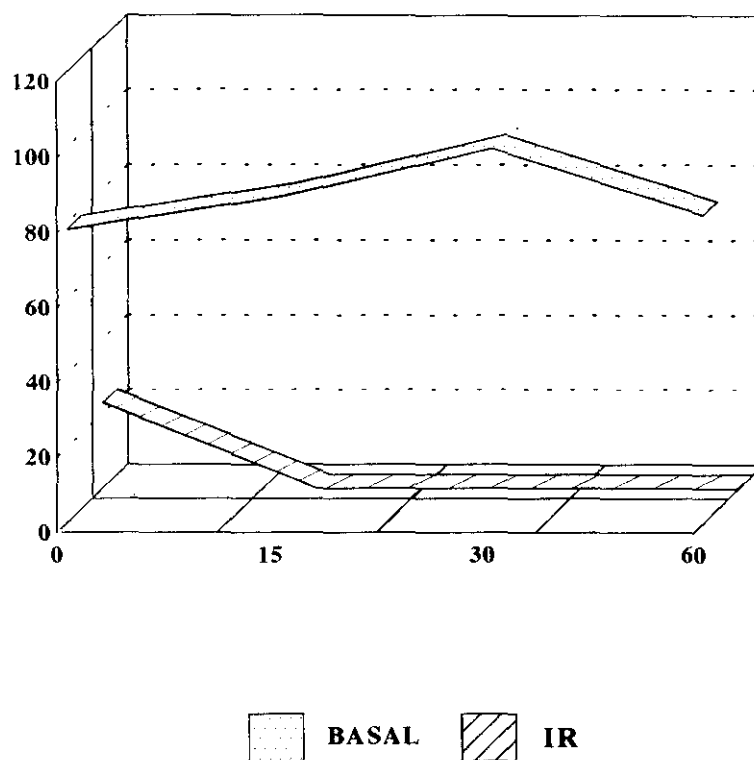


Fig. 13.- Arginina. Perfusión con Somatostatina.

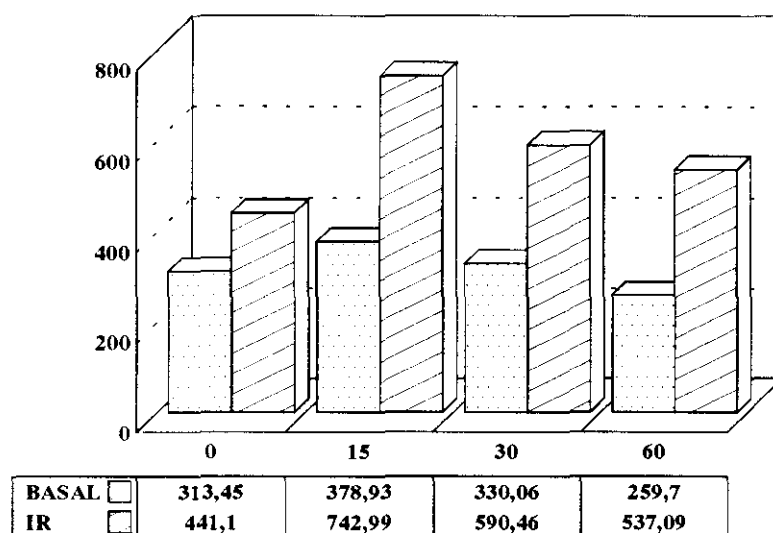
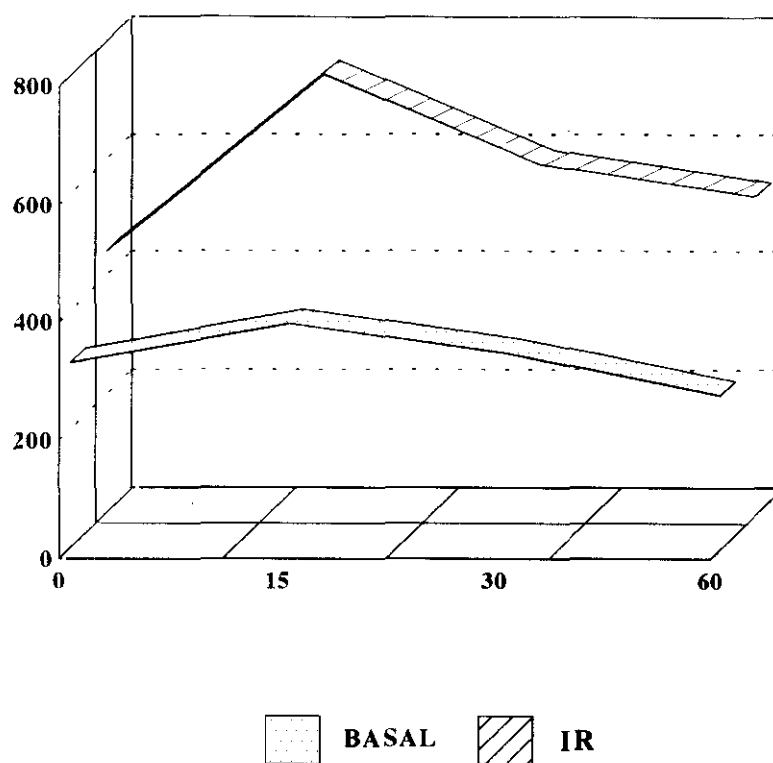


Fig. 14.- Lisina. Serie sin Somstostatina.

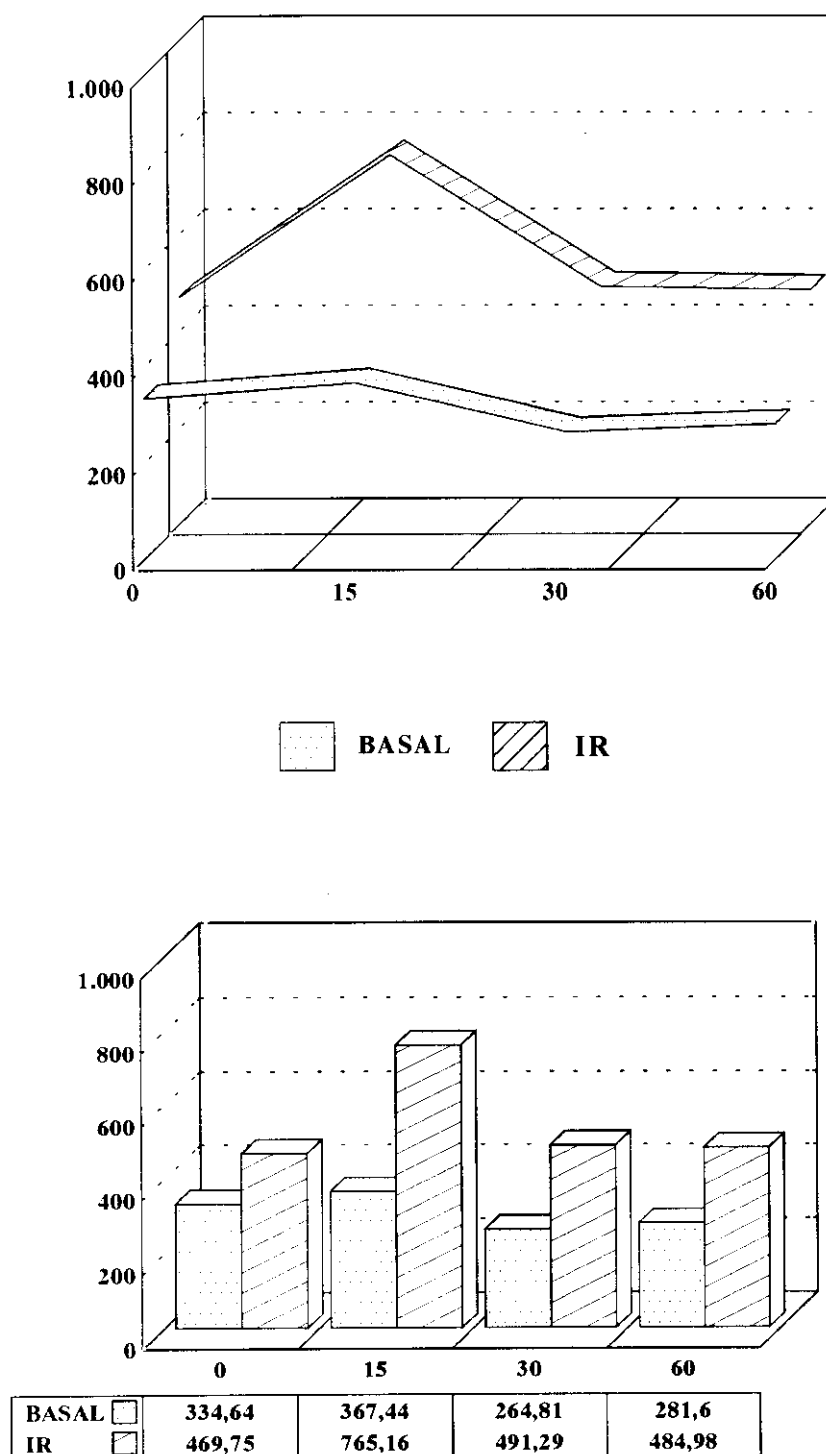
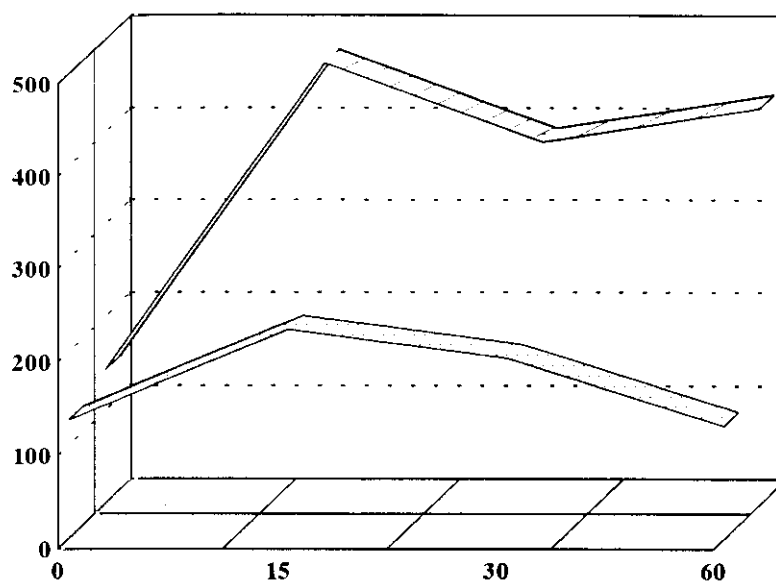
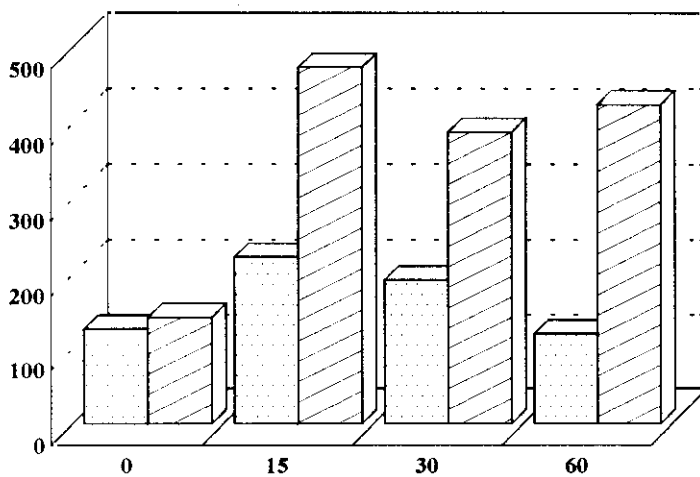


Fig. 15.- Lisina. Perfusión con Somatostatina.



**BASAL**

**IR**



BASAL		127,06	223,68	193,09	121,18
IR		142,94	474,47	389,39	425,98

Fig. 16 - Histidina. Serie sin Somatostatina.



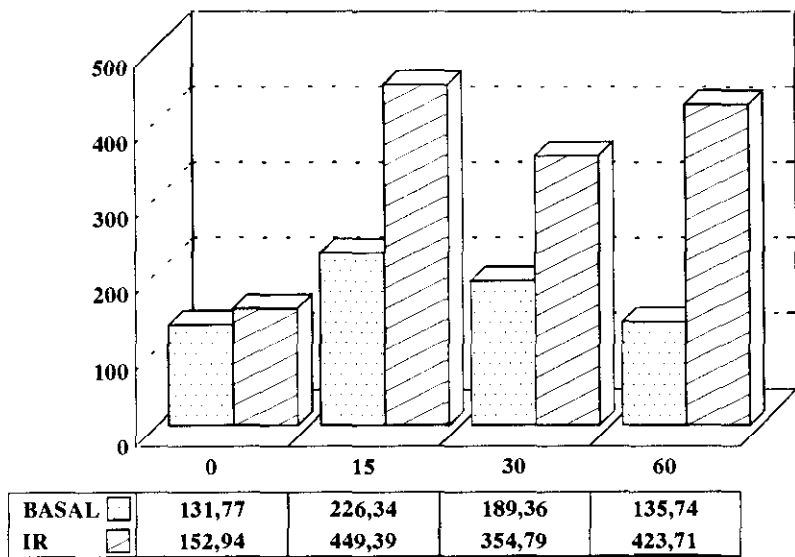
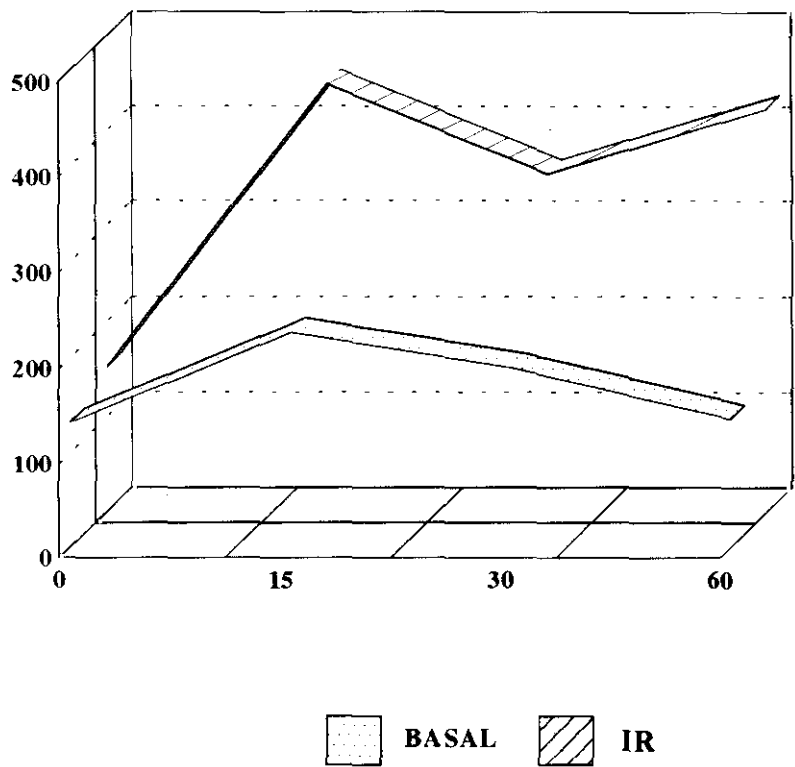


Fig. 17.-Histidina. Perfusión con Somatostatina.

Tabla XXXV.- Comparación de medias del Grupo I. Muestras independientes.

ARGININA	B	I-R	Bss	I-Rss
B	—	p< 0,001	N.S.	—
I-R	p< 0,001	—	—	N.S.
Bss	N.S.	—	—	p< 0,001
I-Rss	—	N.S.	p< 0,001	—

LISINA	B	I-R	Bss	I-Rss
B	—	p< 0,05	N.S.	—
I-R	p< 0,05	—	—	N.S.
Bss	N.S.	—	—	p< 0,01
I-Rss	—	N.S.	p< 0,01	—

HISTIDINA	B	I-R	Bss	I-Rss
B	—	N.S.	N.S.	—
I-R	N.S.	—	—	N.S.
Bss	N.S.	—	—	N.S.
I-Rss	—	N.S.	N.S.	—

Tabla XXXV.- Comparación de medias del Grupo I. Muestras independientes.

ARGININA	B	I-R	Bss	I-Rss
B	—	p< 0,001	N.S.	—
I-R	p< 0,001	—	—	N.S.
Bss	N.S.	—	—	p< 0,001
I-Rss	—	N.S.	p< 0,001	—

LISINA	B	I-R	Bss	I-Rss
B	—	p< 0,01	N.S.	—
I-R	p< 0,01	—	—	N.S.
Bss	N.S.	—	—	p< 0,001
I-Rss	—	N.S.	p< 0,001	—

HISTIDINA	B	I-R	Bss	I-Rss
B	—	p< 0,001	N.S.	—
I-R	p< 0,001	—	—	N.S.
Bss	N.S.	—	—	p< 0,001
I-Rss	—	N.S.	p< 0,001	—

Tabla XXXVI.- Comparación de medias del Grupo II. Muestras independientes.

ARGININA	B	I-R	Bss	I-Rss
B	—	p< 0,001	N.S.	—
I-R	p< 0,001	—	—	N.S.
Bss	N.S.	—	—	p< 0,001
I-Rss	—	N.S.	p< 0,001	—

LISINA	B	I-R	Bss	I-Rss
B	—	p< 0,01	N.S.	—
I-R	p< 0,01	—	—	N.S.
Bss	N.S.	—	—	p< 0,01
I-Rss	—	N.S.	p< 0,01	—

HISTIDINA	B	I-R	Bss	I-Rss
B	—	p< 0,05	N.S.	—
I-R	p< 0,05	—	—	N.S.
Bss	N.S.	—	—	p< 0,01
I-Rss	—	N.S.	p< 0,01	—

Tabla XXXVII.- Comparación de medias del Grupo III. Muestras independientes.

<b>ARGININA</b>	<b>B</b>	<b>I-R</b>	<b>Bss</b>	<b>I-Rss</b>
<b>B</b>	—	p< 0,001	N.S.	—
<b>I-R</b>	p< 0,001	—	—	N.S.
<b>Bss</b>	N.S.	—	—	p< 0,001
<b>I-Rss</b>	—	N.S.	p< 0,001	—

<b>LISINA</b>	<b>B</b>	<b>I-R</b>	<b>Bss</b>	<b>I-Rss</b>
<b>B</b>	—	p< 0,001	N.S.	—
<b>I-R</b>	p< 0,001	—	—	N.S.
<b>Bss</b>	N.S.	—	—	p< 0,01
<b>I-Rss</b>	—	N.S.	p< 0,01	—

<b>HISTIDINA</b>	<b>B</b>	<b>I-R</b>	<b>Bss</b>	<b>I-Rss</b>
<b>B</b>	—	p< 0,01	N.S.	—
<b>I-R</b>	p< 0,01	—	—	N.S.
<b>Bss</b>	N.S.	—	—	p< 0,001
<b>I-Rss</b>	—	N.S.	p< 0,001	—

Tabla XXXVIII.- Comparación de medias del Grupo IV. Muestras independientes.

<b>ARGININA</b>	<b>GRUPO II</b>	<b>GRUPO III</b>	<b>GRUPO IV</b>
<b>GRUPO I</b>	N.S.	N.S.	N.S.

<b>ARGININA-SS</b>	<b>GRUPO II</b>	<b>GRUPO III</b>	<b>GRUPO IV</b>
<b>GRUPO I</b>	N.S.	N.S.	N.S.

<b>LISINA</b>	<b>GRUPO II</b>	<b>GRUPO III</b>	<b>GRUPO IV</b>
<b>GRUPO I</b>	p<0,01	p<0,05	N.S.

<b>LISINA-SS</b>	<b>GRUPO II</b>	<b>GRUPO III</b>	<b>GRUPO IV</b>
<b>GRUPO I</b>	p<0,01	N.S.	N.S.

<b>HISTIDINA</b>	<b>GRUPO II</b>	<b>GRUPO III</b>	<b>GRUPO IV</b>
<b>GRUPO I</b>	p<0,001	p<0,001	p<0,001

<b>HISTIDINA-SS</b>	<b>GRUPO II</b>	<b>GRUPO III</b>	<b>GRUPO IV</b>
<b>GRUPO I</b>	p<0,01	p<0,001	p<0,001

Tabla XXXIX.- Comparación de medias de Isquemia-Reperusión.

## **GRUPO I.-**

Se han comparado las medias (muestras independientes) entre arginina basal y tras isquemia-reperfusión, siendo la diferencia significativa para  $p < 0,001$ ; arginina basal y arginina basal con SS, no significativa; arginina basal con SS y arginina tras isquemia-reperfusión con SS, significativo para  $p < 0,001$ ; y arginina tras isquemia-reperfusión en ambas series, no significativa.

Los niveles de lisina basal se han incrementado significativamente tras isquemia-reperfusión en la serie sin perfusión ( $p < 0,05$ ) y en el grupo con SS ( $p < 0,01$ ), no siendo significativas las diferencias entre las determinaciones basales y tras isquemia-reperfusión de ambas series.

Las modificaciones de los niveles de histidina no obtuvieron significación estadística entre ninguno de los grupos comparados.

## **GRUPO II.-**

Existe una disminución estadísticamente significativa en los niveles de arginina tras isquemia-reperfusión tanto en la serie sin SS ( $p < 0,001$ ) como con SS ( $p < 0,001$ ), no siendo significativas las diferencias entre determinaciones basales y tras isquemia-reperfusión en ambas series.

El incremento de los niveles de lisina mantiene significación estadística con respecto a la determinación basal tanto en la serie sin SS ( $p < 0,01$ ) como en la que se mantuvo la perfusión con SS ( $p < 0,01$ ), no siendo significativas las diferencias entre las determinaciones basales y tras isquemia-reperfusión en ambas series.

La elevación de los niveles de histidina tras isquemia-reperfusión cobra

significación estadística en este grupo ( $p < 0,01$ ) para ambas series, sin que existan diferencias entre las determinaciones basales y tras isquemia-reperfusión de las dos series.

### **GRUPO III.-**

Los niveles de arginina plasmática siguen sin recuperarse tras 30 minutos de perfusión por lo que siguen existiendo diferencias estadísticamente significativas en ambas series ( $p < 0,001$ ) entre los niveles basales y tras isquemia-reperfusión, no siendo significativas las diferencias entre los valores basales y tras isquemia-reperfusión de las dos series.

Se mantienen las mismas diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales y tras isquemia-reperfusión para la lisina en ambas series ( $p < 0,01$ ), no siendo significativas las diferencias entre los valores basales y tras isquemia-reperfusión de las dos series estudiadas.

Siguen existiendo diferencias estadísticas entre los valores basales y tras isquemia-reperfusión en los niveles de histidina, siendo significativas para  $p < 0,05$  en la serie sin perfusión y para  $p < 0,01$  en la serie con SS. No existen diferencias estadísticas entre los valores basales y tras isquemia-reperfusión de ambas series.

### **GRUPO IV.-**

La arginina sigue sin recuperarse tras una hora de perfusión, por lo que se mantiene la significación estadística entre los valores basales y tras isquemia-reperfusión en ambas series. La comparación de medias entre los valores basales y tras isquemia-reperfusión de las dos series, sigue sin ofrecer diferencias estadísticamente significativas.



La elevación de lisina es estadísticamente significativa para  $p < 0,001$  en la serie sin SS y para  $p < 0,01$  en la serie con SS, no existiendo diferencias entre las determinaciones basales y tras isquemia-reperfusión en ambas series.

El incremento de los niveles de histidina es estadísticamente significativo para  $p < 0,01$  en la serie sin SS y para  $p < 0,001$  en la serie con SS, sin que existan diferencias significativas entre las determinaciones basales y tras isquemia-reperfusión para ambas series.

Se han comparado, además, los niveles de arginina tras isquemia-reperfusión entre el grupo I y los grupos II, III y IV en ambas series sin obtener diferencias estadísticamente significativas.

Los niveles de lisina se incrementaron significativamente con respecto al grupo I en la serie sin SS tanto en el grupo II ( $p < 0,01$ ) como en el III ( $p < 0,05$ ), no siendo significativas las diferencias con respecto al grupo IV, mientras que en los animales perfundidos con SS, las diferencias fueron significativas entre el grupo I y el II ( $p < 0,01$ ), pero no entre el grupo I y el III ni entre el I y el IV.

El incremento de los niveles de histidina plasmática en el grupo I mantuvo significación estadística con respecto a los grupos II ( $p < 0,001$ ), III ( $p < 0,01$ ) y IV ( $p < 0,001$ ) en la serie sin SS, así como en la serie de animales a los que se perfundió con SS para los grupos II ( $p < 0,01$ ), III ( $p < 0,001$ ) y IV ( $p < 0,01$ ).

## **DISCUSSION**

La interrupción del aporte sanguíneo a un tejido origina una combinación de acontecimientos bioquímicos que abocan a la muerte celular. El metabolismo aeróbico repone los enlaces de fosfato de alta energía que se precisan para la función celular normal. La falta de oxígeno conduce al metabolismo anaeróbico y al aumento de la concentración basal de ácido láctico cuya acidosis resultante altera la cinética normal de las enzimas, creándose menos enlaces de alta energía, y la célula es privada de la energía necesaria para mantener la homeostasis.

Las alteraciones de la membrana plasmática que se producen durante la isquemia conducen a una pérdida del balance de los iones sodio y calcio, seguida de acidosis, shock osmótico, agrupamiento de la cromatina y picnosis nuclear<sup>100</sup>. El sodio se moviliza hacia el interior de la célula arrastrando agua para mantener el equilibrio osmótico con el espacio intersticial y los iones potasio abandonan la célula para dirigirse al intersticio. Estos cambios se acompañan de la activación de la fosfolipasa mitocondrial, de la pérdida de la fosforilación oxidativa y de una disminución de la producción de ATP. La sobrecarga de calcio conduce a una alteración funcional de la membrana mitocondrial y a su lesión irreversible<sup>101</sup>.

La restauración del flujo sanguíneo restablece el aporte de energía y elimina los metabolitos tóxicos; sin embargo la incorporación de los metabolitos tóxicos a la circulación sistémica puede inducir a graves consecuencias metabólicas y contribuir a una gran lesión tisular local.

Diversos estudios han identificado a los radicales libres derivados del oxígeno como los mediadores de los componentes de la lesión debida a la secuencia isquemia-reperfusión. Los radicales libres del oxígeno pueden producirse mediante la reducción o excitación del oxígeno molecular<sup>32,33,34</sup>. El superóxido es un producto del metabolismo celular normal derivado del proceso del transporte de electrones en la membrana mitocondrial, del reticulopendoplásmico y nuclear y de las proteínas solubles

tales como hemoglobina, aldehído oxidasa y xantina oxidasa. El superóxido es el precursor del peróxido de hidrógeno y de los radicales hidroxilo altamente reactivos<sup>5</sup>. El radical hidroxilo se forma a través de la reacción de Haber-Weiss, catalizada por el hierro y probablemente sea el responsable de la mayor parte de la lesión celular que producen los radicales libres<sup>5,6</sup>. Produce la peroxidación de los lípidos y puede oxidar a los grupos sulfhidrilos, inactivar a las enzimas del citocromo y alterar el transporte de proteínas a través de la membrana.

En los tejidos postisquémicos la enzima xantina oxidasa es una importante fuente de radicales libres<sup>7,8</sup>. Durante la isquemia la xantina oxidasa se acumula en los tejidos, y además se produce un incremento de los niveles tisulares de hipoxantina derivada del AMPc. La xantina oxidasa utiliza oxígeno molecular para convertir a la xantina en hipoxantina, liberándose en dicho proceso superóxido. Por tanto, durante la reperfusión se origina un incremento de los radicales libres.

El efecto más perjudicial de los radicales libres es la peroxidación de los lípidos<sup>35,102</sup> que causa un grave daño celular estructural y funcional. Además contribuyen a la lesión de las proteínas, especialmente aquellas que contienen moléculas no saturadas, sulfuros y ácidos nucleicos.

Tanto la lesión local como la sistémica se asocian con un incremento de neutrófilos en la microvascularización<sup>39,40</sup>. Las interacciones entre neutrófilos y las células endoteliales son la base de la lesión microvascular que se produce durante la lesión por isquemia-reperfusión. Los mediadores químicos que intervienen en este proceso son el PAF, el LTB<sub>4</sub> y los radicales libres de oxígeno. Se ha propuesto que el superóxido producido tras la isquemia-reperfusión reacciona con las células endoteliales promoviendo mediadores de la inflamación tales como el PAF o el LTB<sub>4</sub>, e inducen la expresión y la activación de las glucoproteínas de adhesión endotelial-moléculas de adhesión intercelular tipos 1 y 2, moléculas de adhesión leucocito-endotelial; o inactivan al óxido nítrico derivado del endotelio y a una molécula de

adhesión endógena.

Los neutrófilos activados, con expresión de sus moléculas de adhesión CD<sub>11</sub>/CD<sub>18</sub>, se adhieren y migran a través del endotelio, produciendo lesión local al liberar radicales libres, enzimas proteolíticas (colagenasa, elastasa, cateprina G) y peroxidasa<sup>16,40</sup> (Fig. 18).

El endotelio vascular controla el tono del músculo liso vascular a través de la liberación de hormonas locales o antacoides que incluyen a metabolitos del ácido araquidónico como prostaciclina (PGI<sub>1</sub>), tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) y leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), factor relajante derivado del endotelio (EDRF) y endotelina<sup>40</sup>. Otros mediadores que intervienen en la lesión por isquemia-reperfusión son el factor activador de las plaquetas (PAF), el complemento y las citoquinas interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNFalfa). Las células endoteliales también modifican la respuesta inflamatoria mediante la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión que se unen a las integrinas de los neutrófilos (CD<sub>11</sub>/CD<sub>18</sub>) y median su infiltración.

El óxido nítrico es un radical liberado del aminoácido L-Arginina en diversos tejidos, incluidas las células endoteliales, a través de la vía de activación de una enzima citosólica específica, la óxido nítrico sintetasa, que es dependiente de calcio y que precisa de calmodulina y de fosfato adenina dinucleótido nicotinamida<sup>48,98</sup>. El óxido nítrico es liberado por el endotelio vascular en condiciones basales y en respuesta a numerosos estímulos tales como las fuerzas antiadhesivas, las hormonas circulantes (noradrenalina, vasopresina, bradiquinina) y diversos antacoides (acetilcolina, histamina, sustancia P)<sup>57</sup>.

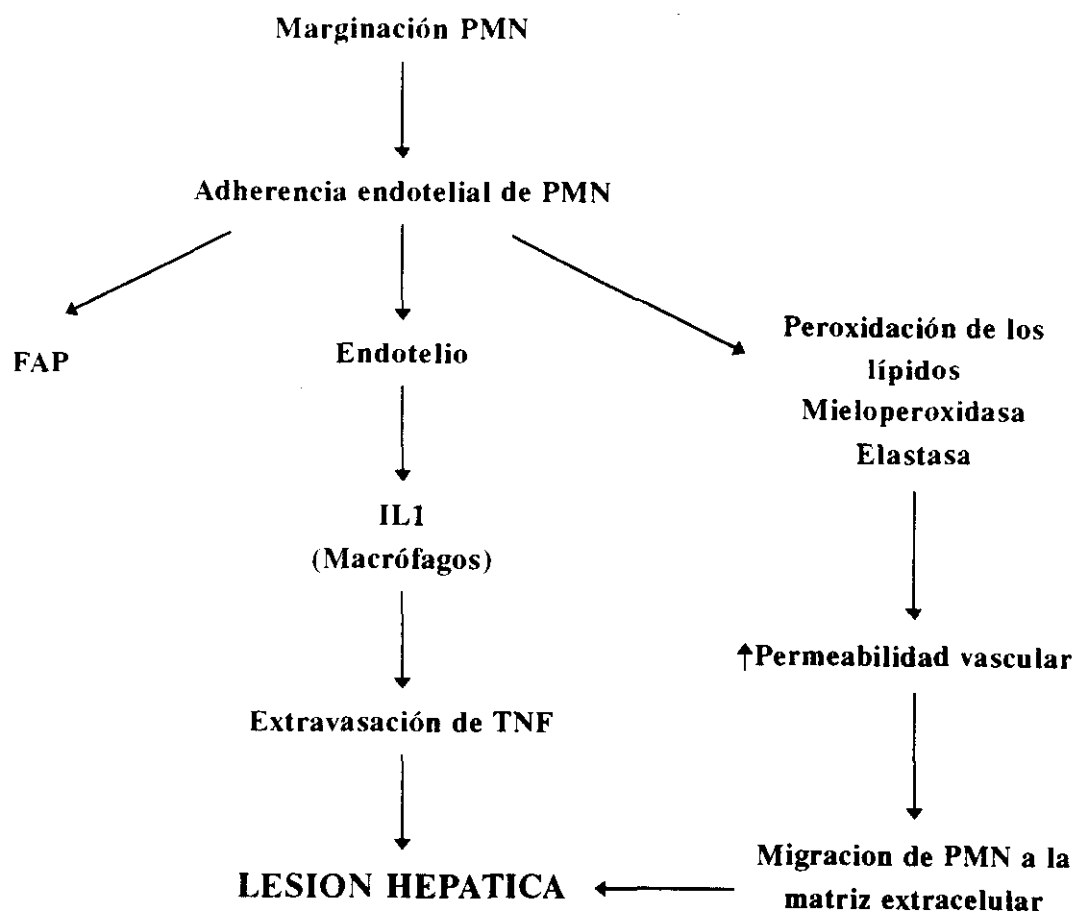


Fig. 18.- Lesión hepática desencadenada tras la marginación de los polimorfonucleares neutrófilos.

Los vasodilatadores tales como la acetilcolina, el ATP y la bradiquinina, inician un flujo interno de iones de Ca, que desencadena en el endotelio la producción y liberación extracelular de óxido nítrico<sup>103</sup>. El óxido nítrico estimula la guanilatociclasa soluble, aumentando la producción intracelular de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) en el músculo liso vascular y en las plaquetas. El incremento en los niveles de GMPc promueve la relajación del músculo liso vascular e inhibe tanto la agregación plaquetaria como la adhesión de las plaquetas al endotelio<sup>48,68</sup>.

En la secuencia isquemia-reperfusión se produce un deterioro de la función endotelial, la liberación de óxido nítrico se encuentra alterada, o el óxido nítrico liberado es inactivado de inmediato por la hemoglobina o por los radicales libres derivados del oxígeno, antes de que pueda ejercer su efecto vasodilatador<sup>103</sup>. Recientemente se ha sugerido que en ciertos estados patológicos el óxido nítrico puede reaccionar con el superóxido para producir especies secundarias citotóxicas a través de la vía del anión peroxinitrito<sup>82</sup>.

Las primeras células que resultan afectadas son las células no parenquimatosas, tales como las células endoteliales, las células de Kupffer y las células que almacenan grasa. En la fase de isquemia caliente la integridad hepática es muy inestable y existen alteraciones estructurales importantes transcurridos treinta minutos, aproximadamente<sup>104-107</sup>. Estudios con microscopio electrónico realizados por W.M. FREDERIK demuestran que inmediatamente después de la isquemia caliente los sinusoides comienzan a rellenarse con restos de los hepatocitos circundantes y de las propias células sinusoidales<sup>108</sup>. Treinta minutos después este material sinusoidal se ve complementado con material citoplasmático que contiene ribosomas o estructuras vesiculares. Noventa minutos después el sinusoides se rellena de material citoplasmático amorfo y restos mitocondriales<sup>106-108</sup>.

Actualmente existen diferentes grupos de estudio encaminados a conseguir la protección del hígado de las lesiones irreparables que tienen lugar durante la fase de isquemia-reperfusión. La citoprotección es necesaria en la cirugía hepática si el hígado se ve sometido a un proceso en el que es posible la lesión celular por isquemia-reperfusión. Esta situación puede surgir cuando sea necesaria la oclusión del pedículo vascular hepático (maniobra de Pringle), para realizar extensas resecciones hepáticas, y es inevitable en el transplante hepático<sup>1,22</sup>.

Existen múltiples mecanismos que participan en la fisiopatología de la lesión por isquemia-reperfusión. Aunque no se conoce cual es la principal vía metabólica que interviene en este proceso, recientemente se ha sugerido que la fase de perfusión es el evento más nocivo en la producción de la lesión celular<sup>1,2</sup>.

Se han ensayado diversas sustancias y métodos para reducir los efectos lesivos de la isquemia-reperfusión hepática. Así, la administración de depredadores de radicales de oxígeno es una vía de tratamiento para preservar al hígado de la lesión por isquemia-reperfusión, al reducir la producción de radicales libres de oxígeno<sup>34</sup>. El alopurinol, un inhibidor de la xantina oxidasa disminuye la formación de radicales libres y evita la oxidación de la hipoxantina durante la perfusión. Otros depredadores, como la superóxido dismutasa, eliminador específico del anión superóxido, y antioxidantes como el CoQ10, actuarían bloqueando la formación de radicales libres en la fase de perfusión y previniendo el aumento de la permeabilidad capilar y la acumulación de neutrófilos en el tejido reperfundido<sup>8,25,28</sup>.

Se sabe que el óxido nítrico proviene exclusivamente del N guanidino terminal de la arginina, un aminoácido catiónico y dibásico que también ocupa una posición clave como intermediario en el ciclo de la urea<sup>64</sup>. La concentración intracelular de arginina en los hepatocitos es muy baja (5 microM) comparada con la concentración plasmática (50 a 100 microM), lo que sugiere que la sangre puede ser



un importante origen de arginina para el hepatocito y que la actividad de transporte de la membrana plasmática puede controlar la disponibilidad de arginina<sup>64</sup>.

El presente trabajo está realizado en ratas utilizando un modelo de oclusión vascular parcial, que permite al flujo portal circular a través de los lóbulos medio, lateral izquierdo y caudado.

Hemos seleccionado la rata como animal de experimentación por cumplir unas condiciones ideales de manejabilidad, fácil instalación y reducido coste, además de fácil disponibilidad de cepas puras (Wistar), con pesos bastante homogéneos. Otros animales como el perro o el cerdo, tienen la ventaja de poder realizar las determinaciones evolutivas sobre el mismo animal. Esto no es posible en la rata ya que después de la extracción de las muestras se produce el fallecimiento del animal.

Este modelo está basado en el descrito en 1.987 por M.W. FLYE y S.YOU<sup>109</sup> y permite valorar la tolerancia del hígado de la rata a la isquemia normotérmica, en ausencia de congestión esplácnica. Se ha alargado el tiempo de isquemia de los 60 minutos referidos por estos autores a 90 minutos, pues con solo administrar 15 UI de heparina por cada 100 gr de peso, intravenosamente, antes de la realización del pinzamiento se descarta la influencia que pudiera tener la trombosis sobre los resultados<sup>47,109</sup>.

En este estudio experimental la posible morbilidad está ligada única y exclusivamente a la lesión del lóbulo hepático implicado en el proceso isquémico. Para comprobar la influencia de la lesión por isquemia-reperfusión parcial, hemos establecido un grupo de supervivencia en el que se comprobó que el daño hepático producido no suponía un deterioro que comprometiera la vida del animal; por tanto el daño por isquemia-reperfusión que afecta aproximadamente a sólo un 20% de la

masa hepática no influye en la posterior viabilidad del animal y las alteraciones fisiopatológicas no tendrían importancia vital; sin embargo las alteraciones bioquímicas podrían reflejar a menor escala los trastornos producidos en el metabolismo de los aminoácidos.

Hemos determinado aminoácidos séricos mediante cromatografía de intercambio iónico, centrando nuestra atención en los aminoácidos básicos arginina, lisina e histidina. La determinación de los valores basales y postisquemia-reperfusión se ha realizado al azar, descartando así el desplazamiento de la columna como posible causa de falsos negativos en la determinación de arginina, último aminoácido detectado, en el suero postreperfusión.

El transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática es un proceso dinámico con capacidad para controlar el metabolismo intracelular.

Existen varios sistemas transportadores de aminoácidos<sup>110</sup>. El sistema  $y^+$  es un sistema de transporte  $Na^+$  independiente que regula el transporte de arginina y de otros aminoácidos catiónicos. Aunque se admite que diversos sistemas de transporte pueden actuar para cada grupo de aminoácidos, el grupo de aminoácidos básicos estaría regulado principalmente por el sistema  $y^+$  y en menor cuantía por el transportador  $Na^+$  independiente  $B^{0,+}$ , de menor afinidad<sup>110-113</sup>. El transporte de arginina está influenciado, además por la presencia de otros aminoácidos catiónicos tales como lisina e histidina a un pH ácido adecuado. A.J. PACITTI y als. han comprobado que las citoquinas pueden jugar un papel mediando la disponibilidad de arginina por el espacio intracelular del hepatocito influyendo en su transporte a través de la membrana plasmática<sup>111</sup>. Concretamente demostraron que el TNF produce una estimulación del sistema de transporte,  $Na^+$ -independiente,  $y^+$  que media la actividad de transporte de la arginina. La potencial importancia del metabolismo de la arginina se ha acentuado

últimamente debido a su exclusivo papel en la síntesis de NO. Los hepatocitos poseen una NO sintetasa inducible  $\text{Ca}^{++}$  independiente y la producción de NO por el hígado está estimulada por endotoxinas y citoquinas<sup>74,75</sup>. J.C. CENDAN y W.W. SOUBA han comprobado además que la  $\text{IL}_1$  juega un importante papel, junto con el TNF, en la estimulación del sistema de transporte de la arginina mediante una regulación autocrina<sup>115</sup>. Estos datos sugieren la posible regulación paralela del transportador y la NO sintetasa (Fig. 19).

Hemos comprobado la disminución de la arginina plasmática tras distintos periodos de reperfusión. El uso de la arginina como marcador biológico no sería pronóstico de la viabilidad del hígado afectado, ya que se ha demostrado que el órgano es viable, sino que indicaría simplemente que en la fisiopatología de la lesión por isquemia-reperfusión interviene la arginina como sustrato para la producción de alguna molécula implicada en el daño por isquemia-reperfusión, o bien que su destrucción masiva, originada por la lesión, interrumpiría alguna ruta metabólica destinada a mantener la integridad hepática. La arginina es un agente protector, en los mamíferos, contra la intoxicación amónica a través del ciclo de la urea<sup>83,115</sup>. La concentración de arginina hepática representa el 5-10% de la arginina plasmática debido a la actividad de la arginasa hepática. E. ROTH y als. han comprobado la disminución de la arginina plasmática tras el transplante hepático como consecuencia de una liberación masiva de arginasa desde el injerto debido a la destrucción de los macrófagos hepáticos<sup>116</sup> sin demostrar relación con el fallo de los injertos.

Se ha constatado una disminución drástica de la arginina desde los primeros momentos de la reperfusión que se mantuvo a los quince, treinta y sesenta minutos postreperfusión. Este descenso de la arginina sérica puede venir determinado por dos mecanismos básicos: destrucción o catabolización, o bien consumo como sustrato en una determinada vía metabólica.

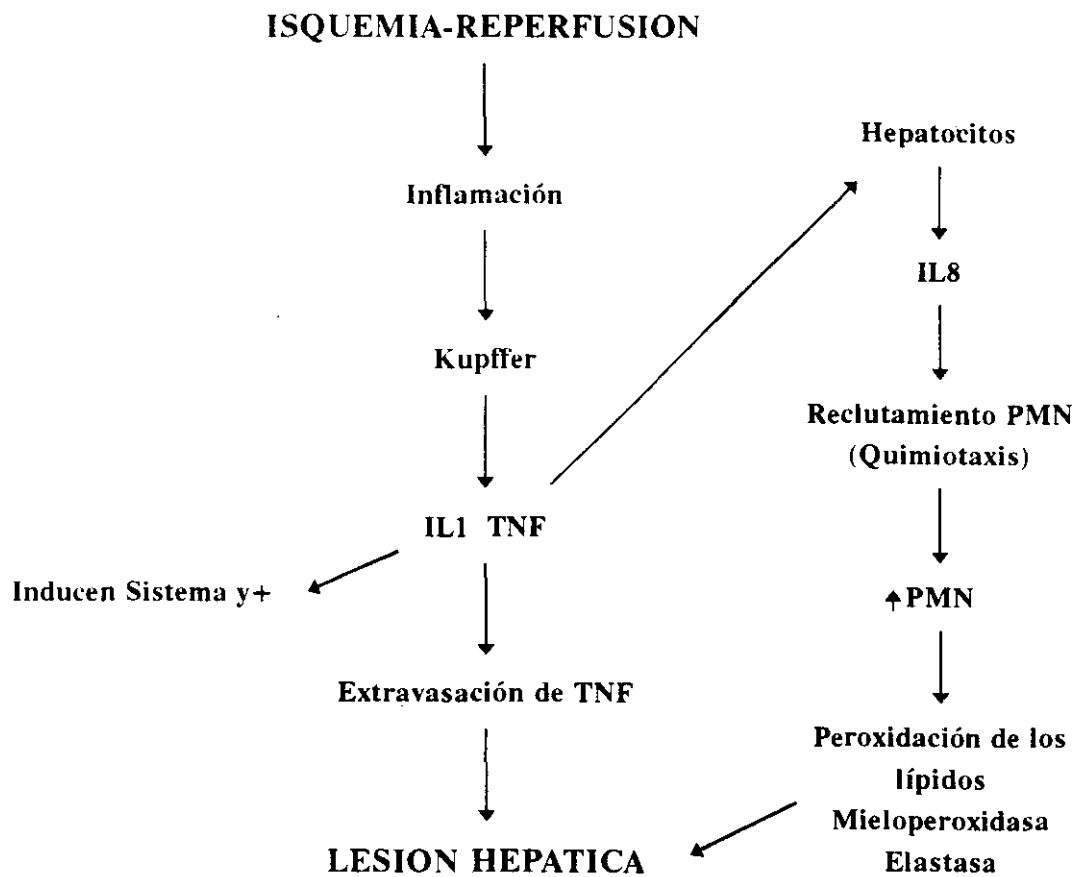


Fig. 19.- Mecanismo de lesión hepática derivada del proceso inflamatorio desencadenado tras la secuencia isquemia-reperfusión.

La lesión hepática que supone el período de noventa minutos de isquemia contribuiría a una desestructuración celular con la liberación de la enzima arginasa desde los hepatocitos y macrófagos hacia el suero desde los primeros momentos de la reperusión, con lo que la arginina sería metabolizada hacia ornitina, implicando al ciclo de la urea en su desintegración, como han comprobado E. ROTH y als. en el transplante hepático<sup>116</sup>. En nuestro modelo experimental la lesión sólo afecta a un 20% de la masa hepática total, sin embargo la arginina sérica desaparece completamente del suero hasta hacerse indetectable. Esta vía metabólica supondría la potenciación de la vía metabólica normal de la arginina a través del ciclo de la urea.

La determinación de niveles elevados de ornitina en el suero postreperusión avalarían esta teoría, así como la determinación de los niveles séricos basales de arginasa y tras reperusión. Así mismo, al añadir una alicuota de arginina al suero postreperusión considerando las condiciones de pH del plasma permitiría comprobar, como un método indirecto, el catabolismo de la arginina por el enzima arginasa contenida en el suero, con lo que los niveles de arginina seguirían siendo indetectables o por lo menos menores que la arginina añadida al suero.

El segundo mecanismo que podría verse comprometido en la lesión por isquemia-reperusión vendría determinado por el transporte de arginina a través del endotelio vascular con la formación de óxido nítrico a partir de su grupo guanidino terminal. La arginina sería desplazada del suero hacia el hígado por un probable mecanismo de demanda de vasodilatación postisquémica<sup>111,114</sup> potenciado por la presencia de productos inflamatorios tales como IL<sub>1</sub> y TNF<sup>74,75,111</sup>. El óxido nítrico es un compuesto muy inestable, estimulador específico de la guanilatociclasa, enzima implicado en la formación de GMPc<sup>92</sup>. El GMPc es el compuesto necesario para la relajación vascular, actuando directamente a nivel de la pared muscular de los vasos sanguíneos<sup>93</sup>. H. JAESCHKE y als. y J.I. LANDA y als. han comprobado en distintos modelos de isquemia-reperusión la disminución progresiva del GMPc hepático en el

hígado sometido a isquemia-reperfusión desde los primeros momentos de la perfusión, cuya formación depende del óxido nítrico actuando como sustrato básico la arginina<sup>117,118</sup>. La disminución progresiva de GMPc refleja el consumo del sustrato necesario para su formación, con lo que tras un tiempo variable las acciones derivadas del GMPc se ven reducidas hasta desaparecer (Fig. 20).

El consumo de arginina sérica por catabolismo y por transporte hepatópeto originaría un déficit en la síntesis de óxido nítrico y por tanto de GMPc al no producirse una estimulación de la guanilatociclase, lo que evitaría la vasorrelajación, favoreciendo además la adhesión y agregación plaquetaria así como la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular<sup>92</sup>. Además la inflamación secundaria al fenómeno de isquemia-reperfusión desencadena la producción a partir de las células de Kupffer de I-L<sub>1</sub>, que actúa sobre los hepatocitos generando la producción de I-L<sub>8</sub>, lo que aumenta el reclutamiento de los polimorfonucleares por un fenómeno de quimiotaxis, y TNF que promueve la adhesión endotelial de los leucocitos polimorfonucleares y cuya extravasación contribuye a potenciar la lesión inflamatoria hepática<sup>119</sup>. El TNF y la IL<sub>1</sub> contribuirían a potenciar el sistema de transporte y<sup>-</sup><sup>111,114</sup>. El incremento de polimorfonucleares y de la agregación plaquetaria contribuyen por sí mismo a la lesión tisular al producir un fallo microvascular y un fenómeno de "no reflujo"<sup>119</sup>. La adhesión de los polimorfonucleares al endotelio promueve la liberación del factor activador de las plaquetas y de IL<sub>1</sub> lo que aumenta la extravasación del TNF. Los leucocitos activados liberan mieloperoxidasa, elastasa, que aumenta la permeabilidad vascular, y desencadenan la peroxidación de los lípidos de membrana a través de los radicales libres<sup>119,120</sup> (Fig. 19).

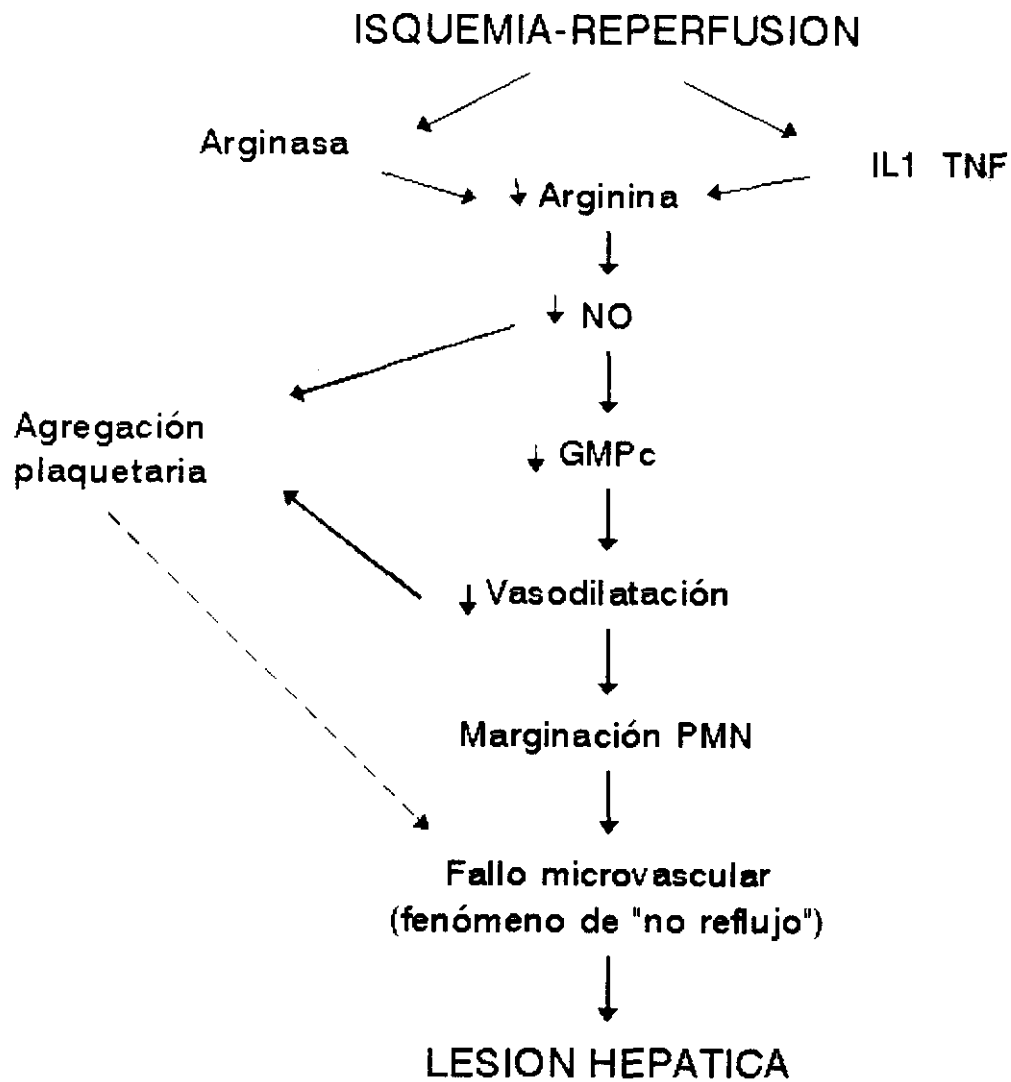


Fig. 20.- Contribución del déficit de arginina a la lesión hepática producida por la secuencia isquemia-reperfusión.

La falta de arginina tras la reperfusión estaría implicada en el déficit de producción de NO, lo que aumentaría la agregación plaquetaria, favoreciendo la lesión tisular al provocar un fallo microvascular y un fenómeno de "no reflujo". Además, al no activarse la guanilatociclasa, disminuiría la producción de GMPc<sup>117-120</sup>, con lo que se vería dificultada la vasodilatación favoreciéndose la marginación de los leucocitos y su adherencia al endotelio, lo que desencadenaría la secuencia de reacciones comentadas anteriormente (Fig. 21).

Según W.W. SOUBA<sup>64</sup> la capacidad del hepatocito para obtener arginina desde el ciclo de la urea es considerable, sugiriendo que la arginina plasmática podría no ser requerida para la síntesis hepática de óxido nítrico. En nuestro modelo experimental se ha comprobado la intensa reducción de los niveles de arginina plasmática como respuesta a la reperfusión postisquémica de sólo una pequeña parte del hígado, reflejando el origen plasmático de la arginina necesario, probablemente, para su incorporación al proceso metabólico de la vía arginina:NO, o bien su catabolismo a partir de la arginasa liberada tras la lesión. El efecto último es la falta de sustrato para lograr mantener la vasorrelajación y evitar la lesión hepática.

Los niveles de arginina se recuperan posteriormente, ya que el animal sobrevive a la lesión, probablemente como consecuencia de dos mecanismos: tras la ingesta, al retornar el animal a la jaula, y a partir de la citrulina como resultado de varias reacciones interorgánicas<sup>121</sup>.

Hemos observado que otros aminoácidos básicos, del mismo grupo que la arginina, incrementan cuantitativamente su valor plasmático de una forma considerable desde los primeros momentos de la reperfusión, llegando a duplicar su valor basal, quizás como un mecanismo de compensación plasmática dentro del mismo grupo de aminoácidos básicos.



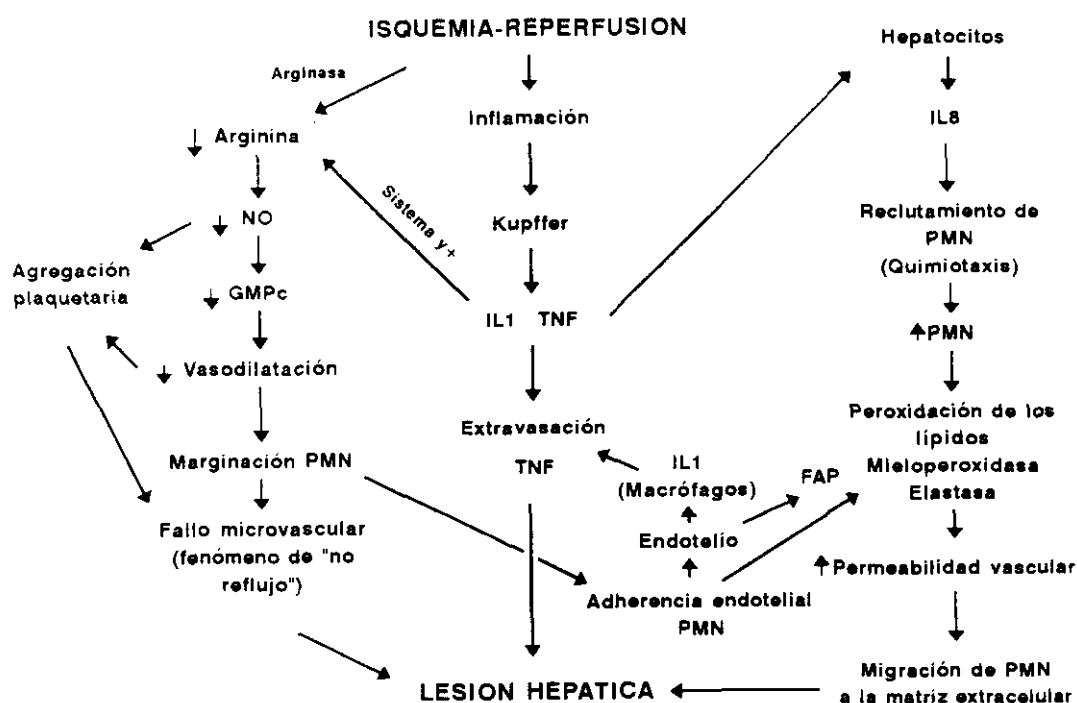


Fig. 21.- Reacciones desencadenadas por la secuencia isquemia-reperfusión.

El incremento de los niveles plasmáticos de Lisina e Histidina en el presente estudio vendría motivado por la saturación de los sistemas transportadores del mismo grupo de aminoácidos por la arginina, debido a una intensa demanda, probablemente originada en el endotelio sinusoidal del remanente hepático sometido a la lesión<sup>111</sup>, que potenciaría el sistema de transporte  $y^+$  para arginina, mediante un mecanismo de inhibición de transporte de otros aminoácidos catiónicos; o bien por una liberación de dichos aminoácidos desde el hígado lesionado, incrementando sus niveles basales<sup>116</sup>.

La recuperación de los niveles basales de dichos aminoácidos probablemente se produce como consecuencia de su ruta metabólica fisiológica<sup>122,123</sup>.

En recientes estudios J.I. LANDA y als<sup>47</sup> han comprobado un efecto citoprotector hepático de SS-14 al producir un aumento selectivo de PGI<sub>2</sub>, prostanoide sintetizado por las células endoteliales, con efecto vasodilatador, antiagregante plaquetario, promotor del metabolismo celular mediado por AMPc (regulador del flujo de Ca desde el espacio intracelular) y posiblemente actuaría bloqueando los canales de calcio dependientes de voltaje, al producir una hiperpolarización de la membrana. Se ha intentado comprobar si, en su efecto citoprotector, la SS-14 podría intervenir como modulador de la disminución de arginina plasmática. No se ha observado modificación estadísticamente significativa en los niveles de arginina en el grupo de ratas sometidas a perfusión continua con SS 14, permaneciendo indetectables los niveles de dicho aminoácido tras reperfusión; si bien siguen elevándose los niveles de lisina e histidina sin que existan diferencias significativas en relación con otros grupos, lo que refleja que en el papel citoprotector de la SS 14 no están implicadas las alteraciones en el metabolismo de la arginina, sin perjuicio de que se mantenga su papel citoprotector al modular el TNF y su extravasación, así como la producción de IL<sub>8</sub> evitando el reclutamiento de PMN y modificando la cadena acontecimientos secundarios a su activación.

## **CONCLUSIONES**

La isquemia durante noventa minutos del lóbulo hepático derecho de la rata Wistar y su posterior reperfusión:

1.- Provoca una disminución drástica en la Arginina basal por consumo de dicho aminoácido desde el pool de Arginina plasmática, manifestada desde los primeros momentos de la reperfusión y mantenida hasta una hora postrevascularización, probablemente a través de una estimulación de los sistemas de transporte hacia el hepatocito y por incremento de su catabolismo por la enzima arginasa, liberada desde el hígado lesionado.

2.- Produce un incremento significativo de los niveles de Lisina plasmática, desde el comienzo de la reperfusión, que se mantiene hasta una hora postrevascularización, probablemente debido a su liberación desde el hígado lesionado; o bien por saturación o modificación de los sistemas de transporte de aminoácidos catiónicos.

3.- Produce, así mismo, un incremento de los niveles de Histidina plasmática durante el mismo período, probablemente por un mecanismo similar.

4.- El papel citoprotector de la Somatostatina 14 no está mediado por la vía Arginina:NO, al no modificarse los niveles de arginina con respecto a los grupos control.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- KORTHUIS RJ, SMITH JK, CARDEN DL. Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. *Am J Physiol* 1.989; 256:H315.
- 2.- PERRY MA, WADHWA SS. Gradual reintroduction of oxygen reduces reperfusion injury in cat stomach. *Am J Physiol* 1.988; 254:G366.
- 3.- WEISS SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand* 1.986; Suppl 548:9.
- 4.- GRANGER DN, HOLLWARTH ME, PARKS DA. Ischemia reperfusion injury: Role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl* 1.986; 548:47.
- 5.- ERNST L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med* 1.988; 16:947-53.
- 6.- ZIMMERMAN BJ, GRANGER DN. Lesión por perfusión. *Clin Quir Nor Am* 1.992; 61-78.
- 7.- PARKS DA, GRANGER DN. Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand* 1.986 Suppl 548:87.
- 8.- PARKS DA, GRANGER DN. Ischemia reperfusion injury: A radical view. *Hepatology* 1.988; 8:680-682.
- 9.- WEISSMAN G. Pathways of arachidonate oxidation to prostaglandins and leukotrienes. *Semin Arthritis Rheum* 1.983; 13:123.

- 10.- ZIMMERMAN BJ, GRISHAM MB, GRANGER DN. Role of oxidants in ischemia-reperfusion induced granulocyte infiltration. *Am J Physiol* 1.990; 258:G185.
- 11.- HERNANDEZ LA, GRISHAM MB, TWOHIG B et al. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 1.987; 253:H699.
- 12.- GRYGLEWSKY RJ, PALMER RM, MONCADA S. Superoxide anion is involved in the break-down of endothelium derived vascular relaxing factor. *Nature* 1.986; 320:454.
- 13.- RUBANYI G, VANHOUTTE PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1.986; 250:H822.
- 14.- GRANGER DN, BENOIT JN, SUZUKI M, et al. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1.989; 257:G683.
- 15.- SUZUKI M, ASAKO HKUBES P, et al. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res* 1.991; 42:125-138.
- 16.- PERRY MA, GRANGER DN. Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. *J Clin Invest* 1.991; 87:1798-1804.
- 17.- BOVERIS A, CADENAS E, STOPPANI AOM. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1.976; 158:435.



18.- NOHL H, JORDAN W, YOUNGMAN RJ. Quinones in biology: Functions in electron transfer and oxygen activation. *Adv Free Rad Biol Med* 1.986; 2:211.

19.- ERNSTER L, NORDENBRAND K. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 1.967; 10:574.

20.- BULKLEY GB. The role oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1.983; 94:407.

21.- CHAUDRY IH, CLEMENS MG, BAUE AE. Alterations in cell functions with ischemia and shock and their correction. *Arch Surg* 1.981; 116:1309-1317.

22.- FORNARDER J, SEEMAN T, HASSELGREN PO. Changes of protein synthesis in liver tissue following ligation of hepatic artery or portal vein in rats. *Eur Surg Res* 1.985; 17:101-108.

23.- CHIEN KR, ABRAMS J, PFAU RG, FARBER JL. Prevention by chlorpromazine of ischemic liver cell death. *Am J Pathol* 1.977; 88:539-558.

24.- FORTNER JG, SHIU MH, KINNE DW. Major hepatic resection using vascular isolation and hypothermic perfusion. *Ann Surg* 1.974; 180:644-652.

25.- MARUBAYASHI S, DOHI K, EZAKI H. Preservation of ischemic rat liver mitochondrial functions and liver viability with CoQ<sub>10</sub>. *Surgery* 1.982; 91:631-637.

26.- MARUBAYASHI S, DOHI K, OCHI K, KAWASAKI T. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: Prevention of damage by alfa-tocopherol administration. *Surgery* 1.986; 99:184-191.

27.- JENNISCHE E. Possible influence of glutathione on postischemic liver injury. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1.984; 92:55-64.

28.- HASSELGREN PO. Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1.987; 164:187-194.

29.- FORNANDER J, HELLMAN A, HASSELGREN PO. Effects of methyl-prednisolone on protein synthesis and blood flow in the postischemic liver. *Circ Shock* 1.984; 12:287-295.

30.- TOLEDO-PEREYRA LH, SIMMONS RL, NAJARIAN JS. Factors determining successful liver preservation for transplantation. *Ann Surg* 1.975; 181:289-298.

31.- NORDSTROM G, SEEMAN T, HASSELGREN PO. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery* 1.985; 97:679-684.

32.- BULKLEY GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1.983; 94:407-411.

33.- McCORD JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng J Med* 1.983; 312:159-164.

34.- ATALLA SL, TOLEDO-PEREYRA LH, McKENZIE GH, CEDERNA JP. Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* 1.985; 40:584-590.

35.- DEL MAESTRO RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand* 1.980; suppl 492:153-168.

36.- VEDDER NB, FOUTY BW, WINN RK, et al. Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock. *Surgery* 1.989; 106:509-516.

37.- JAESCHKE A, FARHOOD A, BAUTISTA AP, et al. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 1.993; 17:915-923.

38.- JAESCHKE H, BAUTISTA AP, SPOLARICS Z, SPITZER JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Rad Res Commun* 1.991; 15:277-284.

39.- FRIEDL HP, SMITH DJ, TILL GO, et al. Ischemia-reperfusion in humans. Appearance of xanthine oxidase activity. *Am J Pathol* 1.990; 136:491-495.

40.- WELBOURN CRB, GOLDMAN G, PATERSON IS, et al. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1.991; 78:651-655.

41.- GIMBROME MA, BROCK AF, SCHAFER AI. Leukotriene B<sub>4</sub> stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1.984; 74:1552-1555.

42.- SPAGNUOLO PJ, ELLNER JJ, HASSID A, DUNN MJ. Thromboxane A<sub>2</sub> mediates augmented polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *J Clin Invest* 1.980; 66:406-411.

- 43.- WELBOURN R, GOLDMAN G, KOBZIK L et al. Neutrophil adherence receptors (CD18) in ischemia. Dissociation between quantitative cell surface expression and diapedesis mediated by leukotriene B<sub>4</sub>. *J Immunol* 1.990; 145:1906-1911.
- 44.- SMEDLY LA, TONNESEN MG, SANDHAU RA, et al. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 1.986; 77:1233-1243.
- 45.- PATERSON IS, KLAUSNER JM, GOLDMAN G et al. Thromboxane mediates the ischemia-induced neutrophil oxidative burst. *Surgery*; 1.989; 106:224-229.
- 46.- HERNANDEZ LA, GRISHAM MB, TWOIG B, et al. Role of neutrophils in ischemia reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 1.987; 253:H699-H703.
- 47.- LANDA JJ, ARIAS J, GOMEZ M, QUADROS M, MORENO A, BALIBREA JL. Cytoprotective effect of somatostatin in a rat model of hepatic ischemic-reperfusion. *Hepatology* 1.992; 16:1474-1476.
- 48.- MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews* 1.991; 43: 109-142.
- 49.- BERRAZUETA JR, LOPEZ-JARAMILLO P, MONCADA S. El óxido nítrico: de vasodilatador endógeno a mediador biológico. *Rev Esp Cardiol* 1.990; 43:421-431.

50.- MONCADA S, GRYGLEWSKI R, BUNTING S, VANE JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1.976; 263:663-665.

51.- FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1.980; 288:373-376.

52.- MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor: biological interactions and significance. En: Verstraete M, Vermynen J, Lijnen HR, Arnout J, eds. *Thrombosis and haemostasis*. Leuven, Belgium, Leuven University Press 1.987; 587-618.

53.- GRYGLEWSKI RJ, PALMER RMJ, MONCADA S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1.986; 320:454-456.

54.- MULSCH A, BOHME E, BUSSE R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from cultured endothelial cells. *Eur J Pharmac* 1.987; 135:247-250.

55.- RUBANYI GM, VANHOUTTE PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1.986; 250:H222-227.

56.- MONCADA S, PALMER RMJ, GRYGLEWSKI RJ. Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1.986; 83:9.164-9.168.

57.- PALMER RMJ, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1.987; 327:524-526.

58.- MONCADA S, HERMAN AG, VANHOUTTE P. Endothelial derived relaxing factor is identified as nitric oxide. *Trends Pharmac Sci* 1.987; 8:365-368.

59.- RADOMSKI MW, PALMER RMJ, MONCADA S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 1.987; 92:181-187.

60.- MONCADA S, PALMER RMJ, HIGG AE. The endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1.988; 12:365-372.

61.- PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1.988; 333:664-666.

62.- MONCADA S. Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. *J Lab Clin Med* 1.992; 120:187-191.

63.- IGNARRO LJ. Signal transduction mechanism involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 1.991; 41:485-490.

64.- INOUE Y, BODE BP, BECK BJ, LI AP. et al. Arginine transport in human liver. Characterization and effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Ann Surg* 1.993; 218: 350-363.

65.- PALMER RMJ, REES DD, ASHTON DS, et al. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1.988; 153: 1.251-1.256.

66.- PALMER RMJ, MONCADA S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1.989; 158:348-352.

67.- LOPEZ-JARAMILLO P, NARVAEZ M, WEIGEL RM, et al. Calcium supplementation reduces the risk of pregnancy-induced hypertension in an Andes population. *Br J Obstet Gynaecol* 1.989; 96:648-655.

68.- RADOMSKI MW, PALMER RMJ, MONCADA S. An L-arginine:nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Ntl Acad Sci USA* 1.990; 87:5193-5197.

69.- RADOMSKI MW, PALMER RMJ, MONCADA S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1.987; 148:1482-1489.

70.-MONCADA S, PALMER RMJ. Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin Perinatol* 1.991; 15:16-19.

71.- KNOWLES RG, PALACIOS M, PALMER RMJ, et al. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1.989; 86:5159-5162.

72.- BREDT DS, SNYDER SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1.990; 87:682-685.

73.- HIBBS JB Jr, TAINTOR RR, VAVRIN Z, et al. Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. In: Moncada S, Higgs EA eds. *Nitric oxide from L-arginine: A bioregulatory system*. Amsterdam: Elsevier 1.990; 189-223.

74.- CURRAN RD, BILLIAR TR, STUEHR DJ, HOFMANN K, SIMMONS RL. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products from Kupffer cells. *J Exp Med* 1.989; 170:1769-1774.

75.- BILLIAR TR, HOFFMAN RA, CURRAN RD, LANGREHR JM, SIMMONS RL. A role for inducible nitric oxide biosynthesis in the liver in inflammation and in the allogenic immune response. *J Lab Clin Med* 1.992; 120:192-197.

76.- WRIGHT CE, REES DD, MONCADA S. Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 1.992; 26:48-57.

77.- McCALL TB, BOUGHTON-SMITH NK, PALMER RMJ, WHITTLE BJR, MONCADA S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* 1.989; 261:293-296.

78.- MARLETTA MA, YOON PS, IYENGAR R, et al. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1.988; 27:8706-87011.



79.- BILLIAR TR, CURRAN RD, STUEHR DJ, WEST MA, BENTZ BG, SIMMONS RL. An L-arginine dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. *J Exp Med* 1.989; 169: 1467-1472.

80.- BECKMAN JS, BECKMAN TW, CHEN J, MARSHALL PA, FREMAN BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1.990; 87: 1620-1624.

81.- LESNEFSKY EJ, FENNESSEY PM, VAN BENTHUYSEN KM, McMURTRY IF, TRAVIS VL, HORWUTZ LD. Superoxide dismutase decreases early reperfusion release of conjugated dienes following regional canine ischemia. *Basic Res Cardiol* 1.989; 84: 191-196.

82.- MATHEIS G, SHERMAN MP, BUCKBERG GD, HAYBRON DM, YOUNG HH, IGNARRO LJ. Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am J Physiology* 1.992; 262:616-620.

83.- BARBUL A. Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *JPEN*. 1.986; 10:227-238.

84.- WHITE MF. The transport of cationic aminoacids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1.985; 822:355-374.

85.- CURRAN RD, BILLIAR TR, STUEHR DJ, ET AL. Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg* 1.990; 212:462-469.

---

86.- HOGG N, DARLEY-USMAR VL, WILSON MT, MONCADA S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J* 1.992; 281:419-424.

87.- McCALL TB, BOUGHTON-SMITH NK, PALMER RMJ, WHITTLE BJR, MONCADA S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* 1.989; 261:293-296.

88.- LEONE AM, PALMER RMJ, KNOWLES RG, FRANCIS PL, ASHTON DS, MONCADA S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem* 1.991; 266:23790-23795.

89.- BILLIAR TR, CURRAN RD, WEST MA, HOFFMAN K, SIMMONS RL. Kupffer cell cytotoxicity to hepatocytes in coculture requires l-arginine. *Arch Surg* 1.989; 124:1416-1421.

90.- BILLIAR TR, CURRAN RD, STUEHR DJ, FERRARI FK, SIMMONS RL. Evidence that activation of Kupffer cells results in production of L-arginine metabolites that release cell-associated iron and inhibit hepatocyte protein synthesis. *Surgery* 1.989; 106:364-372.

91.- HIBBS JB, TAINTOR RR, VAVRIN Z. Iron depletion: possible cause of tumor cell cytotoxicity induced by activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1.984; 123:716-721.

92.- BILLIAR TR, CURRAN RD, HARBRECHT BG, STADLER J, WILLIAMS DL, OCHOA JB, DI SILIVIO M, SIMMONS RL, MURRAY SA. Association between synthesis and release of cGMP and nitric oxide biosynthesis by hepatocytes. *Am J Physiol* 1.992; 262:C1077-C1082.

93.- ARNOLD WP, MITTAL CK, KATSUKI S, MURAD F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1.977; 74:3203-3207.

94.- CURRAN RD, BILLIAR TR, OCHOA JB, HARBRECHT BG, FLINT SG, SIMMONS RL. Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg* 1.990; 212:462-471.

95.- ESTRADA C, GOMEZ C, MARTIN C, MONCADA S, GONZALEZ C. Nitric oxide mediates tumor necrosis factor- $\alpha$  cytotoxicity in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1.992; 186:475-482.

96.- LORENTE JA, LANDIN L, RENES E, DE PABLO R, JORGE P, RODENA E, LISTE D. Role of nitric oxide in the hemodynamic changes of sepsis. *Crit Care Med* 1.993; 21:759-767.

97.- HIBBS JB, TAINTOR RR, VAVRIN Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1.992; 235:473-476.

98.- MONCADA S. The L-arginine:nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1.992; 145:201-227.

99.- CASTAING D, HOUSSIN D, BISMUTH H. Hepatic and Portal Surgery in the rat. *Masson. Paris*. 1.980; 3:37-45.

100.- SANDRITTER WA, REID UN. Morphology of liver cell necrosis. In: Keppler D, ed. Pathogenesis and mechanisms of liver cell necrosis. Lancaster: MTP Press 1.975; 1-14.

101.- FITZPATRICK DB, KARMAZYN M. Comparative effects of calcium channel blocking agents and varying extracellular calcium concentrations on hypoxia-reoxygenation ischemia-reperfusion induced cardiac injury. J Pharmacol Exp Ter 1.984; 228:761-8.

102.- KELLOG EW. Superoxide, hydrogen peroxide and single oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. J Biol Chem 1.975; 250:8812-17.

103.- BASSENGE E. Clinical relevance of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). Br J Pharmacol 1.992; 34:37-42.

104.- MYAGKAYA GL, VAN VEEN HA, JAMES J. Ultrastructural changes in the rat liver during Euro-Collins storage, compared with hypothermic in vitro ischemia. Virchow's Arch V. 1.987; 53:176-182.

105.- CALDWELL-KENKEL JC, THURMAN RG, LEMASTERS JJ. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemia storage of rat liver in Euro-Collins solution. Hepatology 1.987; 7:1048-1051.

106.- McKEOWN CMB. The critical injury of cold preservation of liver allografts in the rat is sinusoidal lining cell damage. Hepatology 1.987; 7:1043-1047.

107.- NORDLINGER HC. Tolerance of human liver to prolong normothermic ischemia. Arch Surg 1.978; 113:1448-1451.

108.- FREDERIK WM, MYAGKAYA GL. The value of enzyme leakage for the prediction of necrosis in liver ischemia. *Histochemistry* 1.983; 78:459-472.

109.- FLYE MW, YU S. The synergistic effect of superoxide dismutase and adenosine triphosphate-Mg C12 on acute hepatic ischemia. *Transpl Proc* 1.987; 19:1.324-1.332.

110.-YUDILEVICH DL, BOYD CAR. Amino acid transport in animal cells. Ed. Manchester University Press. Manchester. 1.987.

111.-PACCITY AJ, COPELAND EM, SOUBA WW. Stimulation of hepatocyte System  $\gamma^-$ -mediated l-arginine transport by an inflammatory agent. *Surgery* 1.992; 112:403-411.

112.- WHITE MF, CHRISTENSEN HN. Cationic amino acid transport in cultured animal cells. II. Transport system barely perceptible in ordinary hepatocytes, but active in hepatoma cell lines. *J Biol Chem* 1.982; 257:4450-4457.

113.- COLLARINI EJ, OXENDER DL. Mechanisms of transport of amino acids across membranes. *Ann Rev Nutr* 1.987; 7:75-90.

114.- CENDAN JC, SOUBA WW, COPELAND EM, LIND DS. Cytokines regulate endotoxin stimulation of endothelial cell arginine transport. *Surgery* 1.995; 117:213-219.

115.- BARBUL A. Arginine: biochemistry, physiology and therapeutic implications. *JPN* 1.986; 10:227-238.

116.- ROTH E, STEINGER R, WINKLER S et al. L-arginine deficiency after liver transplantation as an effect of arginase efflux from the graft. Transplantation 1.994; 57:665-669.

117.- LANDA JI, LLANOS K, MORENO A et al. Papel de la prostaciclina y nucleótidos cíclicos en el efecto citoprotector de la somatostatina-14 en un modelo de isquemia-reperfusión en ratas. Cir Esp 1.992; 52:396-401.

118.- JAESCHKE H, SCHINI VB, FARHOOD A. Role of nitric oxide in the oxidant stress during ischemia/reperfusion injury of the liver. Life Sciences; 50:1797-1804.

119.-TOLEDO-PEREYRA LH, SUZUKI S. Neutrophils, cytokines and adhesion molecules in hepatic ischemia and reperfusion injury. J Am Col Surg 1.994; 179:758-762.

120.- GRACE PA. La lesión ocasionada por la secuencia isquemia-reperfusion. Br J Surg 1.994; 81:637-647.

121.- BARBUL A. Arginine: Biochemistry, physiology, and therapeutic implications. JPEN 1.986; 10:227-238.

122.- LEHNINGER A. Bioquímica. Ed. Omega, S.A. Barcelona. 1.983.

123.- DEVLIN TM. Bioquímica. Ed. Reverté, S.A. Barcelona. 1.989.